

INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.

**ProQuest Information and Learning
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA
800-521-0600**

UMI[®]

Université de Sherbrooke

**Implication du domaine cytoplasmique terminal de la sous-unité $\beta 4A$ des
intégrines pour l'adhésion chez les cellules épithéliales intestinales**

**Par
David Gagné
Anatomie et biologie cellulaire**

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc)
en biologie cellulaire**

Avril 2002



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-74379-9

Canada

Table des matières

TABLES DES MATIÈRES.....	ii
LISTE DES FIGURES.....	vii
ABBREVIATIONS ET SYMBOLES.....	x
RÉSUMÉ.....	xii

I-Introduction

1. Épithélium et matrice extracellulaire de l'intestin.....	1
1.1 Épithélium intestinal et axe crypte-villosité.....	1
1.2 La matrice extracellulaire.....	3
1.3 Les intégrines.....	4
1.4 Les laminines.....	5
2. L'intégrine $\alpha 6\beta 4$.....	7
2.1 Généralités.....	7
2.2 Adhésion cellulaire.....	13
2.3 Migration cellulaire.....	17
2.4 Signalisation intracellulaire.....	20
2.5 Forme $\alpha 6\beta 4$ Actd-.....	24
3. Hypothèse et objectifs.....	25

II – MATÉRIEL ET MÉTHODES

1	Culture cellulaire.....	27
1.1	Cellules HIEC-6.....	27
1.2	Cellules Caco-2/15.....	27
2	Immunofluorescence indirecte.....	28
2.1	Cellules.....	28
2.2	Procédure d'immunofluorescence indirecte.....	28
3	Analyse de protéines par immunobuvardage.....	29
3.1	Préparation des protéines cellulaires.....	29
3.2	Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant.....	31
3.3	Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose.....	31
3.4	Détection des antigènes.....	32
4	Tests d'adhésion cellulaire.....	34
4.1	Préparation des plaques de 96 puits.....	34
4.2	Préparation, récupération et ensemencement des cellules.....	34
4.3	Quantification des cellules adhérees par colorimétrie.....	35
5	Préparation de l'ADNc de β4Actd- et du vecteur d'expression.....	36
5.1	Insertion du fragment Xba I-Not I de β 4A dans pBluescript.....	36

5.2	Création du $\beta 4$ Actd-HA par mutagenèse à partir du fragment $\beta 4$ A Not I-Xba I.....	38
5.3	Insertion du fragment $\beta 4$ A Xba I-Not I muté ($\beta 4$ Actd-HA Xba I-Not I) au domaine cytoplasmique de $\beta 4$	42
6	Fabrication des constructions pLNCX2/ $\beta 4$ A et pLNCX2/ $\beta 4$ Actd-.....	44
6.1	Préparation de l'ADNc de $\beta 4$ A et de $\beta 4$ Actd-HA pour l'insertion dans pLNCX2.....	44
6.2	Préparation du vecteur pLNCX2.....	46
6.3	Insertion de $\beta 4$ A et de $\beta 4$ Actd-HA dans pLNCX2.....	46
7	Infection rétrovirales des cellules HIEC.....	47
7.1	Préparation des virus et infection des cellules.....	47

III-Résultats

1.	Génération de la construction mutante $\beta 4$ Actd-HA.....	49
2.	Génération et analyse des cellules HIEC surexprimant $\beta 4$ A et $\beta 4$ Actd-HA.....	51
2.1	Surexpression des protéines $\beta 4$ A et de $\beta 4$ Actd-HA dans les cellules HIEC.....	51

2.2	Surexpression stable de $\beta 4A$ chez les cellules infectées avec le pLNCX2/ $\beta 4A$	52
2.3	Surexpression stable du $\beta 4Actd-HA$ chez les cellules infectées avec le pLNCX2/ $\beta 4Actd-HA$	55
2.4	Effets de la surexpression de la sous-unité $\beta 4$ sur la sous-unité $\alpha 6$ chez les cellules HIEC.....	57
2.5	La sous-unité $\alpha 6$ s'associe avec la sous-unité $\beta 4$ et non la sous-unité $\beta 1$ chez les cellules HIEC qui surexpriment $\beta 4A$ ou $\beta 4Actd-HA$	60
2.6	Localisation à la membrane cytoplasmique d' $\alpha 6\beta 4A$ chez les cellules HIEC $\beta 4A$, et d' $\alpha 6\beta 4Actd-HA$ chez les cellules HIEC $\beta 4Actd-HA$	61
3.	Propriétés d'adhésion aux laminines des cellules HIECV, HIEC $\beta 4A$ et HIEC $\beta 4Actd-HA$	65
3.1	Adhésion aux laminines.....	65
3.2	Adhésion à la laminine-1 en bloquant la sous-unité $\beta 1$ des intégrines.....	66
3.3	Adhésion à la laminine-1 en bloquant les sous-unités $\alpha 6$ et $\beta 1$ des intégrines.....	71

IV-Discussion

1. Surexpression de la sous-unité $\beta 4A$ ou $\beta 4Actd-HA$ dans les cellules HIEC.....	75
2. Impacts des intégrines $\alpha 6\beta 4A$ et $\alpha 6\beta 4Actd-HA$ sur l'adhésion des cellules HIEC aux laminines.....	81
3. Rôles du fragment ctd du domaine cytoplasmique de $\beta 4A$	86

V-

Conclusions	92
--------------------------	----

REMERCIEMENTS	94
----------------------------	----

BIBLIOGRAPHIE	95
----------------------------	----

LISTES DES FIGURES

I-INTRODUCTION

Figure 1.	Compartimentalisation spatiale cellulaire le long de l'axe Crypte-villosité de l'épithélium intestinal humain.....	2
Figure 2.	Distribution des principales laminines et intégrines le long de l'axe crypte villosité.....	6
Figure 3.	Le complexe $\alpha 6\beta 4$	10
Figure 4.	Le gène $\beta 4$	11
Figure 5.	Schéma d'un hémidesmosome	14
Figure 6.	Activation des voies de signalisation par $\alpha 6\beta 4$	21

II – MATÉRIEL ET MÉTHODES

Figure 7.	Schémas des étapes ayant menées aux constructions pLNCX2/ $\beta 4A$ et pLNCX2/ $\beta 4Actd-HA$... A.....	39
	B.....	40
Figure 8.	Carte du vecteur d'expression pLNCX2.....	45

III-Résultats

Figure 9.	Séquences comparatives des extrémités 5' de l'ADN codant pour les sous-unités $\beta 4A$ et $\beta 4Actd-HA$	50
Figure 10.	Analyse de la surexpression de $\beta 4A$ chez les cellules HIEC $\beta 4A$	53
Figure 11.	Analyse de la surexpression de $\beta 4Actd-HA$ chez les cellules HIEC $\beta 4Actd-HA$	56
Figure 12.	Analyse de l'expression d' $\alpha 6$ par immunoprécipitations séquentielles.....	59
Figure 13.	Analyse de l'association entre $\alpha 6$ et $\beta 1$	62
Figure 14.	Analyse de la surexpression de la sous-unité $\beta 4A$ à la membrane cytoplasmique des cellules HIEC $\beta 4A$	64
Figure 15.	Tests d'adhésion de 30 minutes sur la laminine-1, la laminine-2 et la laminine-10, sans anticorps bloquant l'adhésion médiée par les intégrines.....	67
Figure 16.	Cinétiques de désadhésion des cellules HIECV, HIEC $\beta 4A$ et HIEC $\beta 4Actd-HA$ suite à l'ajout de l'anticorps bloquant $\beta 1$, chez des cellules déjà adhérees.....	70
Figure 17.	Tests d'adhésion de 120 minutes avec un anticorps bloquant $\beta 1$, chez des cellules déjà adhérees depuis 30 minutes.....	72

Figure 18. Tests d'adhésion de 120 minutes avec les anticorps bloquant $\beta 1$ et $\alpha 6$, chez des cellules déjà adhérees depuis 30 minutes.....73

Abréviations et symboles

Note : Comme dans la littérature en général, les acronymes anglophones sont utilisés pour éviter la confusion. Dans la liste des abréviations, le nom est d'abord donné en français puis en anglais (entre parenthèse) dans le but de montrer la provenance de l'acronyme.

ADNc	ADN complémentaire
BP180	Bullous pemphigoid 180
BP230	Bullous pemphigoid 230
CMV	Cytomegalovirus
CS	Segment connecteur (connecting segment)
ctd	Domaine terminal cytoplasmique (cytoplasmic terminal domain)
DMEM	Milieu de Eagle modifié par Dulbecco (Dulbecco modified Eagle's medium)
EBJ	Épidermolyse bullosae jonctionnel
ECL	Enhance chemiluminescence
E. Coli	Escherichia coli
EDTA	Éthylène diamine tétra acide acétique
EGF	Facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor)
ERK	Kinases régulées par des facteurs extracellulaires (extracellular-regulated kinase)
FBS	Sérum de veau foetal (fetal bovine serum)
FGF	Facteur de croissance de fibroblaste (fibroblast growth factor)

ITIM	Motif inhibiteur des cellules-T immunitaires (immune T-cell inhibitory motif)
JNK	Kinases du domaine NH₂-terminal de c-Jun (c-Jun NH₂-terminal kinase)
MAP kinase	Kinases activées par les mitogènes (mitogen-activated protein kinase)
MEK	MAPk/ERK kinase
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (polyacrylamide gel electrophoresis)
pb	paire de base
PBS	Tampon phosphate salin (Phosphate buffer saline)
PI-3K	Phosphatidylinositol 3'-OH kinase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Erreur standard sur la moyenne (standard error on mean)
TAM	Motif d'activation de tyrosine (tyrosine-based activation motif)
TBE	Tris-acide borique-EDTA (Tris base-boric acid-EDTA)
VLA-6	Very late antigen 6
v/v	volume/volume

Résumé

Les récepteurs de la famille des intégrines jouent un rôle important dans la médiation des interactions cellulaires avec la matrice. L'étude de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ chez les cellules épithéliales intestinales humaines a conduit à l'identification de deux formes distinctes de la sous-unité $\beta 4A$ exprimées en fonction de l'état de différenciation: une sous-unité $\beta 4A$ courante qui est retrouvée chez les cellules différenciées et un variant apparemment inactif pour l'adhésion à la laminine auquel il manque un court fragment C-terminal du domaine cytoplasmique ($\beta 4A_{ctd-}$) chez les cellules indifférenciées.

L'objectif du présent travail visait à développer les outils appropriés en vue de déterminer l'implication du domaine cytoplasmique terminal de la sous-unité $\beta 4A$ sur la fonction du récepteur. Dans ce but, les ADNc de $\beta 4A$ (complet) et de $\beta 4A_{ctd-HA}$ (tronqué: délétion des 100 pb encodant le domaine ctd de l'ADNc de $\beta 4A$ plus l'ajout d'une séquence codant pour le marqueur HA) ont été clonés dans le vecteur d'expression pLN/CX2 afin d'effectuer des infections rétrovirales dans des cellules intestinales indifférenciées HIEC. Ceci avait pour but de produire des populations de cellules HIEC surexprimant $\beta 4A$ ou $\beta 4A_{ctd-HA}$ de manière stable. Les analyses par immunobuvardage montrent une surexpression des formes normales et tronquées chez les cellules HIEC $\beta 4A$ et HIEC $\beta 4A_{ctd-HA}$ respectivement, en comparaison des cellules infectées avec le vecteur vide. La surexpression de même que l'expression membranaire des deux formes a été confirmée par immunofluorescence. Également, une augmentation marquée des complexes $\alpha 6\beta 4A$ et $\alpha 6\beta 4A_{ctd-HA}$ a été observée par immunoprécipitation. De plus, des études d'adhésion aux laminines-1, 2 et 10 des cellules HIEC $\beta 4A$ et HIEC $\beta 4A_{ctd-HA}$ avec des anticorps bloquant les sous-unités $\beta 1$ et $\alpha 6$ nous ont permis de démontrer que la perte de l'extrémité ctd du domaine cytoplasmique d' $\alpha 6\beta 4A_{ctd-HA}$ est responsable de la perte des capacités adhésives de cette intégrine. Finalement, nous avons mis en évidence une possible coopération entre l'intégrine $\alpha 6\beta 4A$ et une ou des intégrines non-identifiées composées de la sous-unité $\beta 1$, dans l'activation de l'intégrine $\alpha 6\beta 4A$ pour l'adhésion chez les cellules HIEC $\beta 4A$.

En conclusion, notre étude nous a permis de démontrer l'implication différentielle des intégrines $\alpha 6\beta 4A$ et $\alpha 6\beta 4A_{ctd-}$ dans l'adhésion des cellules cryptales et villositaires intestinales et de mettre en évidence le rôle de l'extrémité ctd de cette sous-unité dans cette implication différentielle.

I-Introduction

1. Épithélium et matrice extracellulaire de l'intestin

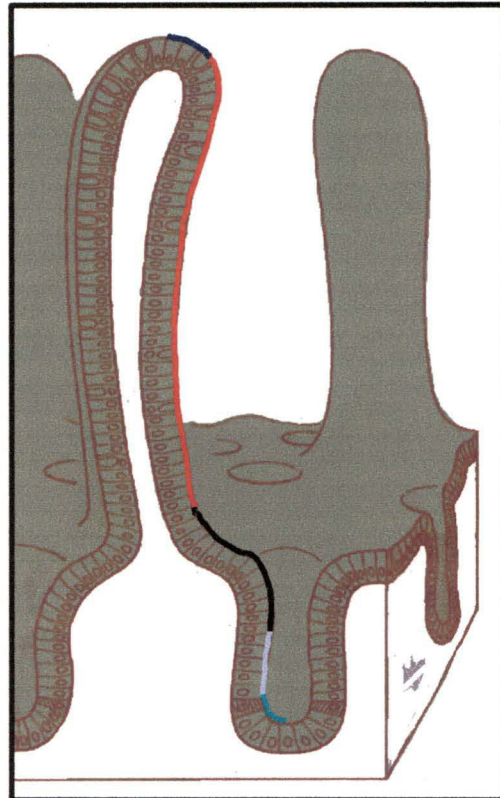
1.1 Épithélium intestinal et axe crypte-villosité

L'épithélium de l'intestin grêle humain, en raison de son renouvellement constant et rapide, constitue un modèle très intéressant pour étudier les mécanismes impliqués dans le renouvellement tissulaire. Il est divisé en deux unités fonctionnelles bien distinctes, la crypte et la villosité (figure 1). La crypte, située dans la partie basse de l'axe crypte-villosité, comprend les cellules prolifératives, les cellules de Paneth et les cellules souches. Les cellules souches sont situées à la base de la crypte, elles sont prolifératives et indifférenciées. Elles donnent naissance à des cellules filles qui continueront à proliférer durant leur ascension vers la villosité. Ceci, jusqu'à ce qu'elles atteignent le tiers supérieur de la crypte où elles entameront alors un processus de différenciation terminale en vue de générer les entérocytes fonctionnels et pleinement différenciés de la villosité (figure 1) (Leblond, 1981; Louvard et al., 1992; Gordon et Hermiston, 1994; Ménard et Beaulieu, 1994). On y retrouvera entre-autres, des cellules absorbantes (les plus nombreuses), des cellules à mucus et des cellules endocrines. Ces cellules continueront leur migration, puis,

**Figure 1. Compartimentalisation spatiale cellulaire le long de l'axe
Crypte-villosité de l'épithélium intestinal humain**

Les cellules souches sont situées à la base de la crypte et sont prolifératives et indifférenciées. Elles donnent naissance à des cellules filles qui continueront à proliférer au niveau du compartiment de prolifération durant leur ascension vers la villosité. Ceci, jusqu'à ce qu'elles atteignent le compartiment de différenciation situé au tiers supérieur de la crypte où elles entameront alors un processus de différenciation. Elles atteindront ensuite la villosité où elles deviendront des entérocytes fonctionnels et pleinement différenciés. Elles entameront finalement un processus normal d'apoptose à l'approche de l'apex de la villosité où elles seront exfoliées dans la lumière intestinale.

	Exfoliation dans la lumière intestinale
Villosité	Cellules différenciées matures
Crypte	Compartiment de différenciation
	Compartiment de prolifération
	Cellules souches



à l'approche de l'apex de la villosité, entameront un processus apoptotique, et seront finalement exfoliées dans la lumière intestinale (Leblond, 1981; Gordon et Hermiston, 1994; Jones et Gores, 1997; Potten, 1997).

1.2 La matrice extracellulaire

Le long de l'axe crypte-villosité, les cellules épithéliales reposent sur un réseau complexe de macromolécules extracellulaires appelé matrice extracellulaire. Celle-ci est composée de deux compartiments principaux; la matrice interstitielle et la lame basale. La matrice interstitielle est très importante pour l'élasticité et la rigidité du tissu. Elle peut contenir plusieurs types de protéines, dont la ténascine, la fibronectine, le collagène de type I et différents protéoglycans (Beaulieu, 1997). La lame basale est une portion spécialisée de la matrice extracellulaire. Elle est principalement composée de collagène de type IV, de perlécan, de nidogène et de différentes laminines (Yurchenco et Schittny; 1990, Beaulieu, 1997). La matrice extracellulaire exerce un profond contrôle sur l'adhésion, la migration, la prolifération et la survie des cellules composant l'épithélium intestinal. Une part importante de ce contrôle provient des interactions entre les laminines matricielles et leurs récepteurs, les intégrines (Beaulieu, 1999; Belkin et Stepp, 2000). Dans le cadre du processus dynamique de renouvellement de l'épithélium intestinal le long de l'axe crypte-villosité, l'attachement de l'épithélium à la matrice extracellulaire, de même que les

signaux qu'il reçoit de celle-ci, sont essentiels dans le maintien de sa structure et de son intégrité.

1.3 Les intégrines

Les effets d'adhésion et de signalisation qu'exerce la matrice extracellulaire sur les cellules épithéliales sont médiés principalement par les intégrines (Burridge et al., 1988; Hynes, 1992; Kumar, 1998; Giancotti et Ruoslahti, 1999,). Ces protéines appartiennent à une famille de récepteurs hétérodimériques transmembranaires. Chacun de ces récepteurs est composé d'une unité α liée de façon non-covalente à une unité β . Jusqu'à maintenant, dix-huit sous unités α et huit sous-unités β ont été découvertes et plusieurs de ces sous-unités existent sous différentes isoformes générées par épissage alternatif (de Melker et Sonnenberg, 1999). Malgré le grand nombre d'hétérodimères $\alpha\beta$ possibles, seulement vingt-trois intégrines différentes ont été caractérisées. Chaque combinaison $\alpha\beta$ existante possède des propriétés de liaison et de signalisation qui lui sont propres (De Melker et Sonnenberg, 1999; Giancotti et Ruoslahti; 1999, Hynes; 1999a). Chacun des différents hétérodimères connus peut-être classé dans une sous-famille dépendamment de sa structure et de ses fonctions. C'est la sous-famille des $\beta 1$ ($\alpha 1$ - $\alpha 11$, α_v) qui comprend également l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ qui est principalement responsable des interactions cellule-matrice (Belkin et Stepp, 2000; Plow et al., 2000).

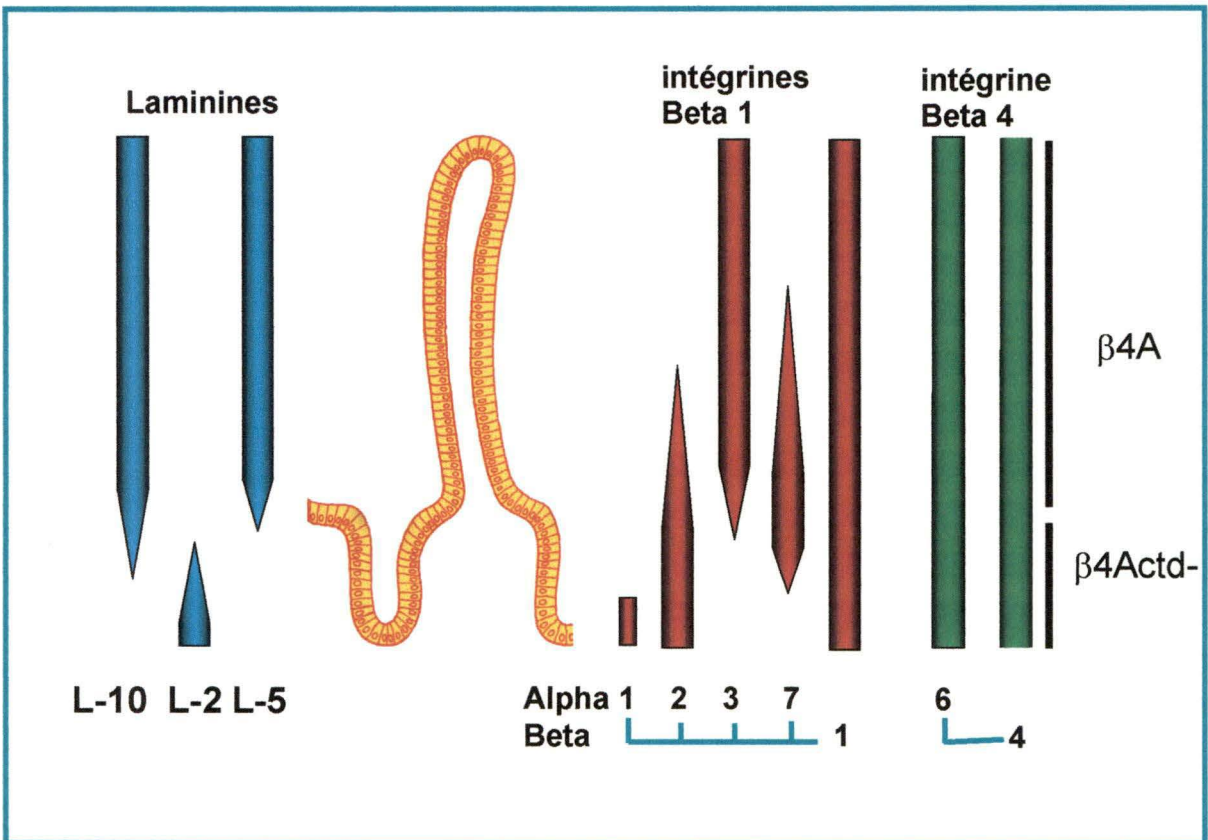
L'expression des différentes intégrines est régulisée de façon spatio-temporelle, chaque intégrine étant exprimée dans différents tissus à différents stades du développement (Adams et Watt, 1993; Rosekelly et al., 1995; Beaulieu, 1997). Au niveau de l'épithélium de l'intestin grêle adulte, les principales intégrines exprimées sont $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha5\beta1$, $\alpha6\beta4$, $\alpha7\beta1$, $\alpha8\beta1$, $\alpha9\beta1$, $\alpha\nu\beta1$, $\alpha\nu\beta3$ et $\alpha\nu\beta6$. De plus, celles-ci sont exprimées de façon différentielle le long de l'axe crypte-villosité (figure 2) (Beaulieu, 1992; Simon-Assmann et al., 1994; Beaulieu et Vachon, 1994; Lussier et al., 2000). La fibronectine, la ténascine, la vitronectine, le collagène de type IV et les laminines sont quelques-unes des protéines qui se retrouvent dans la matrice extracellulaire de l'intestin humain et avec lesquelles les intégrines entretiennent des interactions (Beaulieu, 1999).

1.4 Les laminines

Les laminines sont les principales protéines de la lame basale avec lesquelles les intégrines interagissent. Elles constituent une famille de douze glycoprotéines hétérotrimériques composées d'une sous-unité α , d'une sous-unité β et d'une sous-unité γ qui sont associées en une structure cruciforme (Engvall, 1993; Engvall et Wewer, 1994). Tout comme les intégrines, elles sont exprimées de façon différentielle le long de l'axe crypte villosité (Beaulieu et Vachon, 1994; Perreault et al., 1995; Beaulieu, 1999). Les principales laminines

Figure 2. Distribution des principales laminines et intégrines le long de l'axe crypte villosité

Au niveau de l'épithélium de l'intestin grêle adulte, les principales intégrines exprimées sont $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 6$, de plus, celles-ci sont exprimées de façon différentielle le long de l'axe crypte-villosité. Les intégrines interagissant avec les laminines sont l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ exprimée fortement au niveau de la crypte et faiblement au début de la villosité, l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ exprimée fortement au niveau de la villosité, l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ exprimée fortement de la fin de la crypte au début de la villosité et l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ exprimée faiblement au niveau des cryptes. L'intégrine $\alpha 6\beta 4A$ est exprimée à la base des cellules épithéliales de la villosité et son isoforme ne possédant pas les 31 derniers acides aminés du domaine cytoplasmique de la sous-unité $\beta 4$, l'intégrine $\alpha 6\beta 4Actd-$ est exprimée uniquement au niveau de la crypte. Les laminines exprimées sont : la laminine-1 qui est exprimée du centre de la crypte à l'apex de la villosité, la laminine-2 qui est exprimée de la base au centre de la crypte et la laminine-5 qui est exprimée de la partie supérieure de la crypte à l'apex de la villosité.



exprimées le long de l'intestin grêle adulte sont les laminines-2, 5 et 10 (figure 2). Certaines recherches, étudiant la distribution différentielle et réciproque des laminines-2 et 10 le long de l'axe, ont d'ailleurs permis de trouver une corrélation entre la distribution de ces protéines et l'apparition des marqueurs de différenciation sur des modèles entérocytaires humains in vitro (Beaulieu et Vachon, 1994; Ménard et Beaulieu, 1994; Vachon. et. Beaulieu, 1992, 1995). Ceci suggérerait une relation entre la forme de laminine exprimée et l'état de différenciation cellulaire in vivo. Cela permet donc de comprendre l'intérêt porté aux rôles potentiellement instructifs que peuvent avoir sur la cellule, les différentes interactions entre intégrines et laminines le long de l'axe crypte villosité.

2. L'intégrine $\alpha 6\beta 4$

2.1 Généralités

L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ a été identifiée à quatre reprises par différents groupes entre 1979 et 1989, avant d'être finalement et formellement reconnue comme une nouvelle intégrine en 1989 (Kennel, 1979; Kimmel et Carey, 1986; Sonnenberg et al., 1988b; Kajiji et al., 1987, 1989; Hemler et al., 1989; Kennel et al., 1989; Van Waes et al., 1991). La sous-unité $\alpha 6$ de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ a d'abord été identifiée comme faisant partie du complexe VLA-6 (very late antigen 6), plus tard renommé l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ (Hynes, 1987; Sonnenberg et al., 1987; 1988a;

Hemler et al, 1988). $\alpha 6$, qui peut s'associer aux sous-unités $\beta 1$ ou $\beta 4$, est une protéine de 1073 acides aminés et est constituée d'une chaîne lourde de 120 kDa extra-cellulaire reliée par un pont disulfure à une chaîne légère transmembranaire d'environ 30 kDa (figure 3). La protéine existe sous trois variantes différentes ($\alpha 6A$, $\alpha 6B$, $\alpha 6p$) produites par épissage alternatif du gène de 3200 paires de bases (Tamura et al., 1990, 1991; Hogervorst et al. 1991; 1993). L'isoforme $\alpha 6B$ est 18 acides aminés plus longue au niveau du domaine cytoplasmique que l'isoforme $\alpha 6A$, tandis que l'isoforme $\alpha 6p$ est tronquée au niveau de la chaîne lourde et ne fait au total que 70 kDa (Hogervorst et al. 1991; Davis et al., 2001).

Pour ce qui est de la sous-unité $\beta 4$, le gène a été séquencé pour la première fois en 1990 par trois équipes différentes (Hogervorst et al., 1990; Suzuki et Naitoh, 1990; Tamura et al., 1990). C'est un gène de 5600 paires de bases codant pour une protéine de 1778 acides aminés (figure 3). Le gène possède quatre sites d'épissage résultant en cinq formes variantes du domaine cytoplasmique de la protéine ($\beta 4A$ à E) (figure 4). Les formes B et C proviennent d'insertion dans le cadre de lecture de 159 et 210 paires de bases, tandis que la forme D résulte d'une délétion dans le cadre de lecture de 21 paires de bases (Hogervorst et al., 1990; Clarke A.S et al., 1994; Fornaro et Languino, 1997; Pulkkinen et al. 1997a; Van Leusden M.R. et al., 1997). La forme E, une protéine de seulement 964 acides aminés ayant le domaine cytoplasmique fortement tronqué, est produite par l'insertion de 37pb qui provoque l'apparition

d'un codon d'arrêt prématuré suite au changement du cadre de lecture (de Melker et Sonnenberg, 1999). Récemment, notre laboratoire a identifié une nouvelle variante de la sous-unité $\beta 4A$, la sous-unité $\beta 4Actd-$, qui est présente dans les cryptes de l'épithélium de l'intestin grêle humain et qui n'est pas produite par épissage alternatif (Basora et al., 1999). Cette variante, qui ne possède pas les 20-30 derniers acides aminés du domaine cytoplasmique de la sous-unité $\beta 4$, serait fonctionnellement différente de la sous-unité $\beta 4A$ (voir section 2.5). Le long domaine cytoplasmique de la sous-unité $\beta 4A$ est composé de plus de 1000 acides aminés et il ne comporte aucune homologie avec les autres domaines cytoplasmiques beaucoup plus courts (50–100 acides aminés) des autres sous-unités β connues. Il est composé de deux paires de répétitions fibronectines de type III séparées par un segment connecteur de 142 acides aminés (figure 3) (Nievers et al., 1998). Ces deux paires de répétitions fibronectines de type III agissent comme un ressort donnant à la fois résistance et élasticité à la protéine (Hynes, 1999b). Il possède également de nombreux sites potentiels de phosphorylation sur tyrosine et sur sérine, incluant des sites TAM (tyrosine-based activation motif) et ITIM (immune T-cell inhibitory motif) (Mainiero et al., 1995; Alt et al., 2001; Shaw, 2001). Le domaine cytoplasmique particulier de la sous-unité $\beta 4$ est très important car il médie les propriétés uniques d'adhésion, de migration, de signalisation et de survie de l'intégrine (Mercurio et al., 2001). Habituellement, mais non obligatoirement, c'est la ligature de la partie extracellulaire d' $\alpha 6\beta 4$ aux laminines qui permet au domaine cytoplasmique de

Figure 3. Le complexe $\alpha 6\beta 4$

$\alpha 6$ est une protéine constituée d'une chaîne lourde de 120 kDa extracellulaire reliée par un pont disulfure à une chaîne légère transmembranaire d'environ 30 kDa, le tout est formé de 1072 acides aminés : 1 à 1011 extracellulaires, 1012 à 1037 transmembranaires et 1038 à 1073 cytoplasmiques. $\beta 4$ est une protéine de 205 kDa composée de 1778 acides aminés : 1 à 710 extracellulaires, 712 à 734 transmembranaires et 735 à 1778 cytoplasmiques. Le domaine cytoplasmique est formé de deux paires de répétitions fibronectines de type III séparées par un segment connecteur (CS) de 142 acides aminés. Les sites de liaison pour la plectine et BP180 de même que les 31 derniers acides aminés sont identifiés par des accolades ouvrantes.

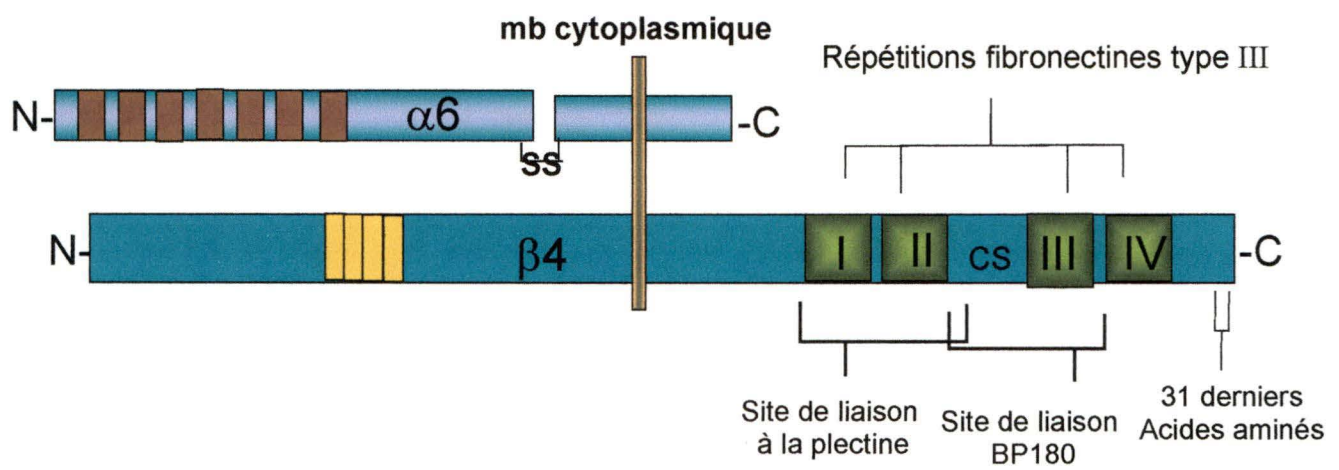
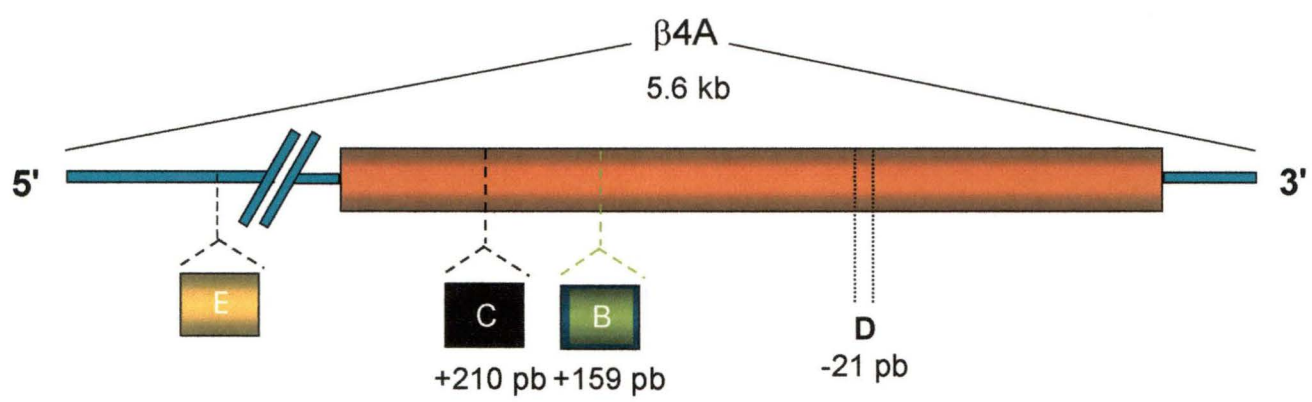


Figure 4. Le gène $\beta 4$

Le gène de $\beta 4$ est formé de 5600 paires de bases et possède quatre sites d'épissage. Ces sites résultent en cinq formes variantes du domaine cytoplasmique de la protéine ($\beta 4A$ à E). Les formes B et C proviennent d'insertions dans le cadre de lecture de 159 et 210 paires de base, tandis que la forme D résulte d'une délétion dans le cadre de lecture de 21 paires de base. La forme E découle de l'insertion de 37pb qui provoque l'apparition d'un codon arrêt après 114 acides aminés suite au changement du cadre de lecture.



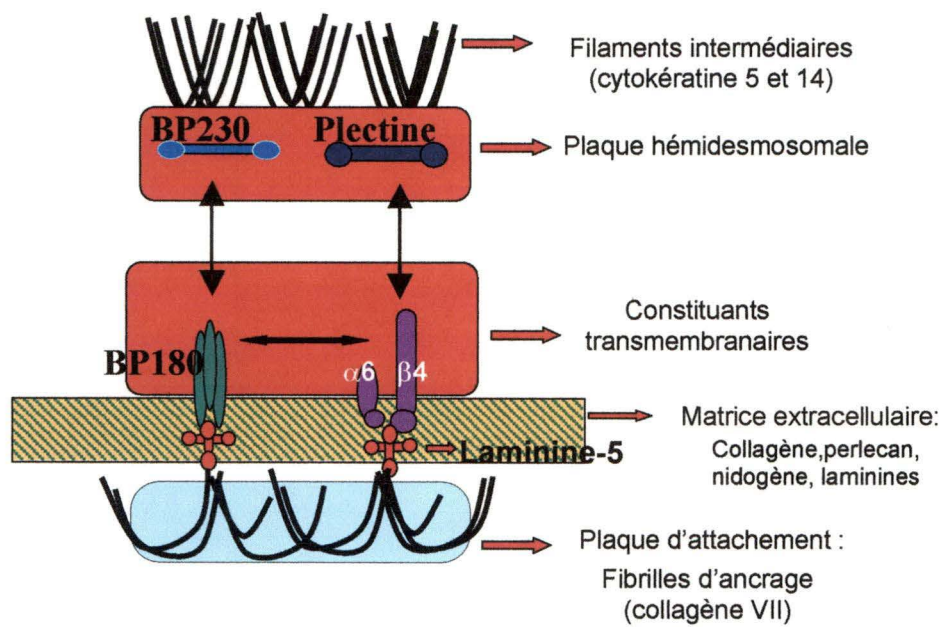
l'intégrine de remplir ses différentes fonctions (Nievers et al., 1998). $\alpha 6\beta 4$ est un récepteur pour les laminines-1, 2, 4, 5 et 10, mais c'est avec la laminine-5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$) qu'elle a le plus d'affinité (Niessen et al., 1994; Rouselle et Aumailey, 1994; Toseran A. et al., 1994; Spinardi et al., 1995). Elle se lie à celle-ci via le domaine globulaire de la chaîne $\alpha 3$ de cette laminine (Rouselle et al., 1995). Pour ce qui est de la biosynthèse d' $\alpha 6\beta 4$, l'association entre les précurseurs des sous-unité $\alpha 6$ et $\beta 4$ aurait lieu au niveau du réticulum endoplasmique dans un processus impliquant la chaperonne transmembranaire calnexine. Puis, plus tard, le pro- $\alpha 6$ serait coupé en une chaîne lourde et en une chaîne légère au niveau du trans-Golgi par l'enzyme furine (Rigot et al., 1999). Plusieurs tissus peuvent exprimer une ou plusieurs des isoformes des deux sous-unités de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ (Hogervorst et al., 1993), mais c'est principalement dans les différents épithéliums que l'on retrouve la majorité de cette intégrine (Sonnenberg et al., 1990). Pour ce qui est de l'axe crypte-villosité, on peut retrouver $\alpha 6\beta 4$ constitutivement exprimée à la base de l'épithélium intestinal. Notre laboratoire a démontré qu'on retrouve principalement la sous-unité $\beta 4A$ dans les villosités et la sous-unité $\beta 4Actd$ - dans les cryptes (Basora et al., 1999). Une recherche d'une autre équipe rapporte qu' $\alpha 6B$ est l'isoforme d' $\alpha 6$ prédominante au niveau de l'épithélium glandulaire du colon (Hogervorst et al., 1993). De façon intéressante le principal ligand d' $\alpha 6\beta 4$, la laminine-5, n'est présent que dans la villosité et dans la partie supérieure de la crypte, ce qui correspond à la distribution de la sous-unité $\beta 4A$ complète le long de cet axe (figure 2) (Leivo et al., 1996; Orian-Rousseau et al., 1996; Basora et al. 1999).

2.2 Adhésion cellulaire

Comme mentionné précédemment, l'attachement des différentes cellules épithéliales à leur matrice extracellulaire est d'une importance cruciale pour le maintien de la structure et de l'intégrité du tissu. Pour cette raison, un rôle majeur joué par l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ consiste en son implication dans un complexe multiprotéique d'adhésion appelé hémidesmosome (figure 5). Ce dernier est très important pour l'attachement stable des cellules épithéliales à leurs membranes basales sous-jacentes (Nievers, 1999). Le nom hémidesmosome provient de l'apparence de ce complexe qui ressemble, en microscopie électronique, à un demi desmosome. Il est composé principalement de quatre protéines qui forment un lien à la base de la cellule entre la lamine-5 extracellulaire et le réseau de filaments intermédiaires cellulaires (figure 5). La laminine-5 est liée du côté N-terminal (avec l'aide des laminines-6 et 7) aux fibrilles d'ancrage (collagène de type VII). Ces dernières constituent, avec le collagène interstitiel, la plaque d'attachement de l'hémidesmosome (Champaud et al., 1996; Masunaga et al., 1996; Rousselle et al., 1997). Du côté C-terminal, la laminine-5 se lie aux récepteurs cellulaires transmembranaires $\alpha 6 \beta 4$ et BP180 (Niessen et al., 1994; Rousselle et Aumailley, 1994; Töseren A. et al., 1994; Spinardi et al., 1995; Reddy et al., 1998). BP180 est un récepteur transmembranaire de type II, ce qui signifie que son domaine C-terminal se trouve du côté extracellulaire de la membrane plasmique. À l'intérieur de la cellule, $\alpha 6 \beta 4$ et BP180 se lient avec les

Figure 5. Schéma d'un hémidesmosome

L'hémidesmosome est composé principalement de quatre protéines qui forment un lien à la base de la cellule entre la matrice extracellulaire et le réseau de filaments intermédiaires cellulaires. La laminine-5 est liée d'un côté aux fibrilles d'ancrage qui constituent, avec le collagène interstitiel, la plaque d'attachement de l'hémidesmosome. De l'autre côté, la laminine- 5 se lie aux récepteurs cellulaires transmembranaires $\alpha 6\beta 4$ et BP180. À l'intérieur de la cellule, $\alpha 6\beta 4$ et BP180 se lient avec les constituants de la plaque hémidesmosomale : BP230 et HD1/plectine. Ces deux protéines médient le lien entre les éléments transmembranaires et les filaments intermédiaires de cytokeratine.



constituants de la plaque hémidesmosomale: BP230 et HD1/plectine (Tanaka et al., 1991). Ces deux protéines font partie de la famille des plaquines, qui comprend les protéines qui servent d'intra-connecteurs et d'inter-connecteurs pour les différents réseaux du cytosquelette (Yang et al. 1996; Ruhger et Watt, 1997; Fontao et al. 2001). Dans le cas des hémidesmosomes, BP230 et HD1/plectine médient le lien entre les éléments transmembranaires et les filaments intermédiaires de cytokératine (Skalli et al. 1994; Yang et al. 1996). Il existe deux formes d'hémidesmosome : les hémidesmosomes matures de type I, présents dans la plupart des épithéliums et possédant les 4 protéines hémidesmosomales; et les hémidesmosomes de type II, qui sont formés uniquement d' $\alpha 6\beta 4$ et de HD1/Plectine, et qui ne sont présents que dans quelques épithéliums, dont l'épithélium villositaire intestinal.

Plusieurs observations ont démontré qu' $\alpha 6\beta 4$, qui possède des sites de liaison pour les protéines HD1/Plectine et BP180, joue un rôle central dans l'assemblage des hémidesmosomes (Dowling et al., 1996; Schaapveld et al. 1998). Les sites de liaison de la sous-unité $\beta 4$ permettraient un rapprochement de ces protéines et de BP230, ce qui leur donnerait ainsi la chance d'interagir entre elles pour former le complexe d'adhésion. Ainsi, certaines personnes souffrant d'une extrême fragilité de la jonction derme-épiderme, appelée épidermolyse bullosae jonctionnel (EBJ), montrent des mutations dans le gène codant pour $\beta 4$ et ne peuvent assembler de véritables hémidesmosomes (Niessen et al., 1996; Pulkkinen et al., 1997b).

Des transfections de divers mutants de $\beta 4$ dans des kératinocytes qui n'expriment pas de $\beta 4$ endogène (provenant de patients souffrant d'EBJ), ont démontré que le site de liaison pour la HD1/plectine de cette sous-unité est essentiel pour la formation des hémidesmosomes (Schaapveld et al. 1998). Ce site comprend la première paire de répétitions fibronectines type III de même que les acides aminés 1328 à 1355 du segment connecteur du domaine cytoplasmique de $\beta 4$. De plus, ces mêmes acides aminés chevauchent un autre site du segment connecteur qui lierait le bout C-terminal de ce domaine cytoplasmique. Lorsque l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ n'est pas liée à la laminine-5, cette liaison causerait le repliement de la dernière paire de fibronectines type III, ce qui formerait alors une boucle qui rendrait inaccessible les sites de liaison à BP180 (Rezniczek et al., 1998; Schaapveld et al., 1998; Nievers et al., 2000). Dans ce cas, en se liant, la HD1/Plectine libérerait le bout C-terminal de $\beta 4$, permettant à son domaine cytoplasmique de se déplier et ainsi de lier BP180 (Schaapveld et al., 1998). Suite à la liaison de BP180, le recrutement de BP230 au complexe complète la formation d'un hémidesmosome mature de type I. Au niveau des villosités de l'intestin grêle humain, l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ et la HD1/plectine s'assemblent en l'absence de BP180, de BP230 et des fibrilles d'ancrage, pour former des hémidesmosomes de type II (Leivo et al., 1996; Fontao et al., 1997; Stutzmann et al., 2000). De plus, trois raisons tendent à démontrer que ces hémidesmosomes ne se formeraient qu'au niveau des villosités : d'abord parce qu'on retrouve la lamine-5 seulement dans les villosités (Leivo et al., 1996; Fontao et al., 1999), ensuite parce que les cellules de la crypte n'expriment pas

de HD1/plectine (Orian-Rousseau et al., 1996) et finalement parce que ces mêmes cellules expriment la sous-unité $\beta 4$ Actd- qui ne semble pas fonctionnelle pour l'adhésion aux laminines (Basora et al., 1999). Les hémidesmosomes de type I sont des complexes d'adhésion stables et élaborés qui conviennent bien aux cellules des épithéliums qui migrent peu. Au contraire, les cellules épithéliales de l'intestin humain migrent rapidement, ce qui expliquerait leur besoin de former des hémidesmosomes de type II, un complexe qui leur permettrait donc une plus grande liberté de migration.

Le fait qu' $\alpha 6\beta 4$ Actd- ne semble pas fonctionnelle pour l'adhésion est intéressant : cette intégrine ne possède pas l'extrémité C-terminale lui permettant de lier le segment connecteur et ainsi de former le repliement de son domaine cytoplasmique. Existerait-il un lien de cause à effet entre ces deux éléments? Cette question constitue une des interrogations auxquelles nos études tenteront de répondre.

2.3 Migration cellulaire

La formation de complexes d'adhésion n'est qu'une des fonctions médiées par l'intégrine $\alpha 6\beta 4$. Ses propriétés d'adhésion aux laminines lui confèrent également un rôle important dans la migration des cellules épithéliales, et donc, par le fait même, dans l'invasion des cellules cancéreuses. Un des pré-requis

pour la migration ou pour l'invasion d'une cellule est, bien sûr, qu'elle ne doit pas posséder de complexes d'adhésion stables. Les mécanismes exacts par lesquels s'effectue le démantèlement des hémidesmosomes ne sont pas encore connus, mais de nombreuses études récentes ont apporté des éclaircissements sur le fonctionnement de ce phénomène. Ainsi, suite à une stimulation avec de l'EGF, $\alpha 6\beta 4$ peut s'associer au récepteur de l'EGF et être phosphorylée sur certaines tyrosines du domaine cytoplasmique de sa sous-unité $\beta 4$. Ce processus impliquant Fyn, un membre de la famille des kinases Src, causerait la dissociation des hémidesmosomes (Mariotti et al. 2001). D'autres études ont également démontré que la phosphorylation de certaines sérines du domaine cytoplasmique de $\beta 4$, via la protéine kinase C, provoque également les mêmes effets (Rabinovitz et al., 1999; Alt et al., 2001). Ces processus de dissociation des hémidesmosomes permettraient aux cellules de pouvoir récupérer $\alpha 6\beta 4$ afin d'utiliser ses propriétés adhésives dans les processus de migration et d'invasion cellulaire. $\alpha 6\beta 4$ agirait alors pour stabiliser le réseau d'actine (Rabinovitz et al., 1999; Mercurio et Rabinovitz, 2001). Comme le domaine cytoplasmique de la sous-unité $\beta 4$ ne possède pas de séquence consensus pour lier directement le réseau de filaments d'actine, la liaison pourrait potentiellement se produire indirectement via la protéine hémidesmosomale HD1/plectine qui possède des sites de liaison pour l'actine et pour $\beta 4$ à chacune de ses extrémités (Wiche, 1998; Fontao et al., 2001; Mercurio et al., 2001). Le complexe formé ressemblerait alors à un hémidesmosome de type II. Cette interaction permettrait ainsi au système de traction cellulaire actine-myosine d'utiliser $\alpha 6\beta 4$ comme

point d'ancrage dans les lamellipodias, les filopodias et les traînées de rétraction (Rabinovitz et Mercurio, 1997; Lotz et al., 1999; Rabinovitz et al. 1999, Mercurio et al., 2001). Un exemple concret de ce phénomène, tant au niveau de l'épithélium intestinal qu'au niveau de l'épiderme, est la guérison de blessure. Le modèle de guérison suggère que les cellules voisinant la blessure démantèlent leurs hémidesmosomes afin de redistribuer $\alpha 6\beta 4$ à la base de renflements formés de filaments d'actine. Les renflements se transformeront ensuite en lamellipodias, puis la cellule migrera sur un tapis de laminines vers le centre de la blessure (Gibson et al., 1993; Goldfinger et al., 1999; Lotz et al. 2000).

Comme les informations recueillies sur la migration cellulaire proviennent habituellement de cellules épithéliales cancéreuses, beaucoup plus mobiles que des cellules normales, le rôle occupé par l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ dans ce processus le long de l'axe crypte-villosité n'est toujours pas connu. De plus, il est maintenant reconnu que les cellules cancéreuses utiliseraient $\alpha 6\beta 4$ lors de l'invasion, non seulement pour ses propriétés adhésives, mais également pour sa capacité de transduction de signaux, ce qui complique encore plus le rôle de cette intégrine dans la migration cellulaire (Shaw et al., 1997; Rabinovitz et al., 1999; Unkeless et Jin, 1997; O'connor et al. 1998; Shaw, 2001).

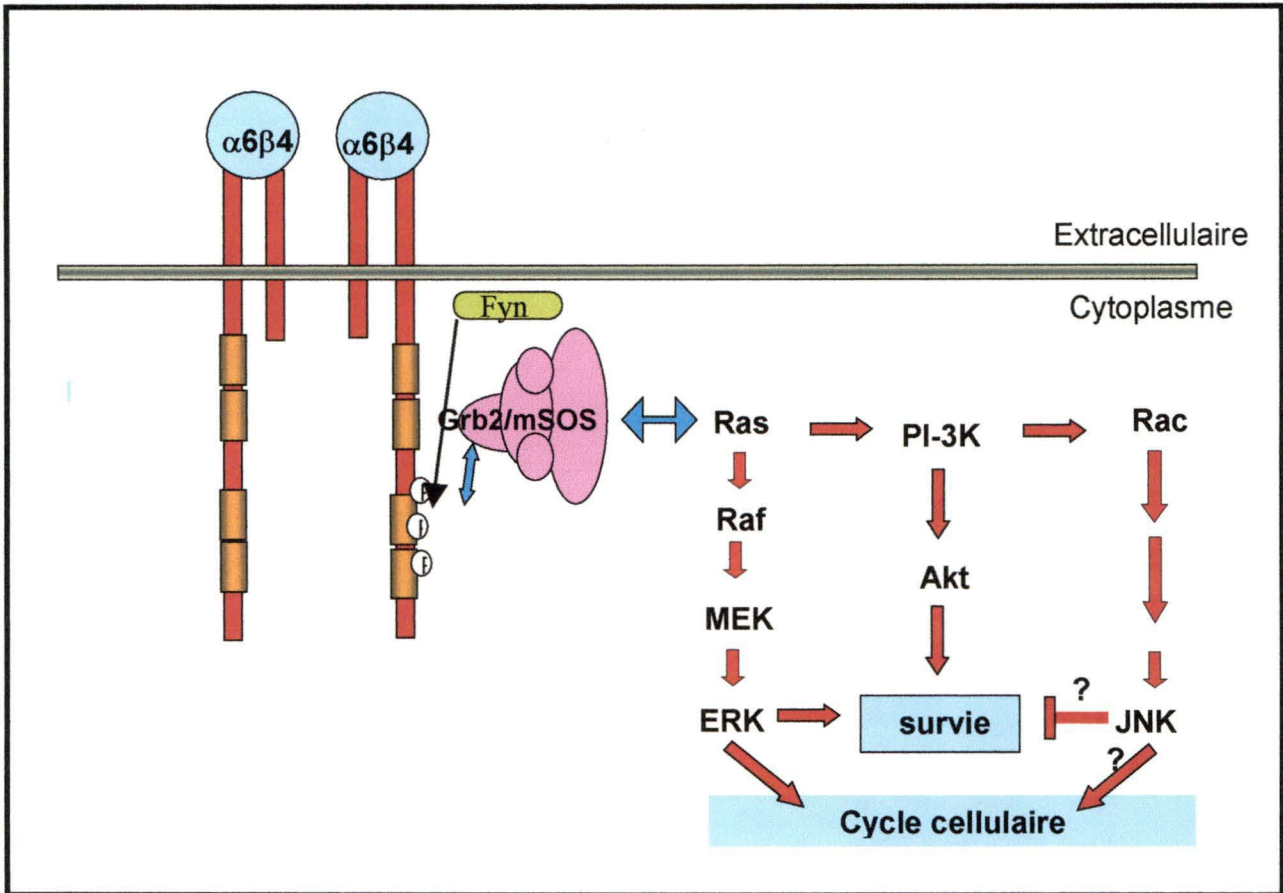
2.4 Signalisation intracellulaire

En plus de ses fonctions dans l'adhésion aux laminines, $\alpha 6\beta 4$ est très impliquée dans les voies de signalisation régulant la migration, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Maniero et al., 1995; Shaw et al., 1997; Gauthier et al., 2001b). La phosphorylation de certaines tyrosines clés de son domaine cytoplasmique suite à la liaison d'un ligand (ou encore suite à un traitement à l'EGF chez les cellules en culture) est l'élément crucial permettant l'activation de ces voies de signalisation (Maniero et al., 1995; Dans et al. 2001). Un des mécanismes d'activation d' $\alpha 6\beta 4$ les plus étudiés s'exécute suivant la phosphorylation, possiblement par Fyn, une kinase de la famille src, de la tyrosine 1526 du domaine cytoplasmique de la sous-unité $\beta 4$ (figure 6) (Dans et al. 2001). Suite à cette phosphorylation, il y a recrutement de la protéine adaptatrice Shc. À son tour, Shc recrutera l'échangeur Grb2/mSOS, pour ensuite activer Ras, menant ainsi à la stimulation de voies de signalisation (Mainiero et al., 1995 ; 1997; Giancotti, 1997; Dans et al., 2001). Les principales voies susceptibles d'être stimulées sont Raf / MEK / ERK-1 et 2, Rac / JNK et PI3-K / AKT (figure 6) (Mainiero et al., 1997; Giancotti, 1997; Kumar, 1998).

L'implication d' $\alpha 6\beta 4$ dans l'activation de la voie des MAP kinases a permis de démontrer l'importance de cette intégrine dans la prolifération cellulaire (Treisman, 1995; Mainiero et al., 1997; Murgia et al., 1998). Un exemple

Figure 6. Activation des voies de signalisation par $\alpha 6\beta 4$

La phosphorylation par Fyn de tyrosines spécifiques du domaine cytoplasmique de la sous-unité $\beta 4$ provoque le recrutement de la protéine adaptatrice Shc qui à son tour recrutera l'échangeur Grb2/mSOS qui activera Ras, menant ainsi à la stimulation de voies de signalisation. Les principales voies susceptibles d'être stimulées sont Raf / MEK / ERK-1et 2, Rac / JNK et PI3-K / AKT.



montrant un lien entre la prolifération et l'expression d' $\alpha 6 \beta 4$ se retrouve chez des souris n'exprimant pas le domaine cytoplasmique de $\beta 4$ et exhibant des déficiences prolifératives au niveau des cellules de leurs compartiments prolifératifs intestinaux (Murgia et al., 1998). Également, les cellules Caco-2/15, qui proviennent d'un clone d'adénocarcinome de colon humain (Beaulieu et Quaroni, 1991; Vachon et Beaulieu, 1992; Vachon et al., 1996), expriment une quantité plus élevée d' $\alpha 6 \beta 4$ lors de la phase exponentielle de prolifération qu'au cours de la phase de différenciation (résultats non-publiés de notre laboratoire). D'ailleurs, les lignées cellulaires cancéreuses intestinales qui expriment le plus d' $\alpha 6 \beta 4$ sont, en général, celles qui ont les moins bonnes capacités de différenciation (résultats non-publiés de notre laboratoire). Par ailleurs, la surexpression d' $\alpha 6 \beta 4$ chez les cellules RKO, provenant d'un carcinome de colon humain, montre une augmentation significative d'apoptose et un arrêt de prolifération qui serait médié par p21 (Clarke et al., 1995). D'autres indications illustrent également le lien entre $\alpha 6 \beta 4$ et la survie cellulaire. Ainsi, des souris knock-out pour la sous-unité $\beta 4$ présentent des signes évidents d'apoptose dans tous leurs épithéliums (Dowling et al., 1996). Également, l'apoptose induite par la privation de FGF et de sérum dans des cellules endothéliales vasculaires est complètement enrayée par des traitements avec des anticorps dirigés contre $\beta 4$ (Miao et al., 1997). D'autres études montrent, chez des cellules cancéreuses ayant un p53 actif, la capacité d' $\alpha 6 \beta 4$ à stimuler l'apoptose via l'activation de Bax et l'inactivation caspase dépendante de AKT-PKB (Baheldere et al., 1999a; 1999b). À l'inverse, $\alpha 6 \beta 4$ peut promouvoir la survie cellulaire chez les cellules

cancéreuses ayant un p53 inactif via l'inactivation du pro-apoptotique Bad et l'activation de la voie PI-3K/AKT (Baheldere et al, 1999b; Tang et al.,1999). Enfin, l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ contribue au maintien de la survie des entérocytes humains différenciés (Gauthier et al., 2001b)

La voie PI-3K, en plus de son rôle dans la survie cellulaire, est probablement la voie régulée par $\alpha 6\beta 4$ la plus importante pour la migration cellulaire. En effet, la phosphorylation de la tyrosine 1494, située dans un site ITIM du domaine cytoplasmique de la sous-unité $\beta 4$, permet l'activation de la PI-3K chez des cellules cancéreuses ce qui stimule grandement la migration et l'invasion de ces cellules (Unkeless et Jin, 1997; Shaw, 2001). De plus, le rôle d' $\alpha 6\beta 4$ dans la migration et l'invasion cellulaire ne serait pas absolument dépendant de sa fonction mécanique de point d'ancrage : des études effectuées chez des cellules cancéreuses ensemencées sur des substrats sans laminine, ou encore en compagnie d'anticorps inhibant les interactions adhésives d' $\alpha 6\beta 4$, ont confirmé une augmentation de la migration et de l'invasion reliées à l'activation de la voie des PI-3K par cette intégrine (Shaw et al., 1997; O'connor et al. 1998; Rabinovitz et al., 1999). Cette activation, qui est ligand indépendante, s'expliquerait par une coopération entre $\alpha 6\beta 4$ et erbB2, un récepteur de la famille des récepteurs de l'EGF (Gambaletta et al., 2000; Hinterman et al., 2001; Mercurio et Rabinovitz, 2001). $\alpha 6\beta 4$ peut également augmenter la migration et l'invasion via l'activation directe de la petite protéine G Rho (O'Connor et al., 2000). Cette protéine est d'ailleurs reconnue pour être

impliquée dans le contrôle de l'organisation du cytosquelette et dans la formation des lamellipodias (Hall, 1998).

À la suite des études faites sur les rôles d' $\alpha 6\beta 4$ dans la stimulation des voies de signalisation qui contrôle le cycle cellulaire, nous pouvons facilement comprendre l'influence de cette intégrine sur le cheminement des cellules et plus particulièrement l'apport qu'elle peut avoir sur les processus qui mènent à la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses.

2.5 Forme $\alpha 6\beta 4$ Actd-

Comme mentionné précédemment, notre laboratoire a découvert une nouvelle variante de la sous-unité $\beta 4A$, la sous-unité $\beta 4$ Actd- (Basora et al., 1999). Cette protéine n'est pas reconnue par un anticorps dirigé contre les 31 derniers acides aminés du domaine cytoplasmique de $\beta 4A$. Cette forme $\beta 4$ Actd- est exprimée par les cellules épithéliales de la crypte de l'intestin grêle humain. C'est également sous cette forme qu'on retrouve la sous-unité $\beta 4$ dans les cellules HIEC, un modèle normal des cellules indifférenciées de la crypte (Perreault et Beaulieu, 1996; Basora et al., 1999). Les cellules de la villosité, comme leur équivalent in vitro, les cellules Caco-2/15, expriment la sous-unité $\beta 4A$ complète (Beaulieu et Quaroni, 1991; Vachon et Beaulieu, 1992; Vachon et al., 1996). Les expériences de radiomarquage ont permis de suggérer que la

perte du domaine cytoplasmique terminal (ctd) se faisait de façon co-translationnelle et non suite à un épissage alternatif (Basora et al. 1999). Également, les résultats de tests d'adhésion effectués à l'aide des cellules HIEC et Caco-2/15 sur de la laminine-5 montrent que contrairement à l'intégrine $\alpha6\beta4A$ complète, l'intégrine $\alpha6\beta4Actd-$ ne serait pas fonctionnelle pour l'adhésion (Basora et al. 1999). De plus, cette même intégrine ne semblerait pas contribuer au maintien de la survie des entérocytes indifférenciés (Gauthier et al., 2001b).

3. Hypothèse et objectifs

L'intégrine $\alpha6\beta4$ agirait donc sur la régulation de plusieurs fonctions cellulaires dont l'adhésion, la migration, la prolifération et la survie, via l'activation du domaine cytoplasmique de sa sous-unité $\beta4$. Par contre, les cellules cryptales intestinales humaines expriment une sous-unité $\beta4Actd-$ qui apparaît non-fonctionnelle pour l'adhésion aux lamimines.

Notre hypothèse est que le domaine ctd régularise la fonctionnalité de la sous-unité $\beta4$ pour l'adhésion via un mécanisme impliquant des changements au niveau de la conformation et/ou de la phosphorylation de cette sous-unité.

Le but de mon projet de maîtrise consistait donc à déterminer le rôle du fragment ctd de l'intégrine $\alpha6\beta4A$ sur l'adhésion, la prolifération et la différenciation entérocytaire.

Les objectifs spécifiques consistaient à :

- 1) Produire un ADNc mutant codant pour la sous-unité $\beta4Actd-$ de l'intégrine
- 2) Surexprimer les sous-unités $\beta4A$ et $\beta4Actd-$ chez les cellules HIEC
- 3) Effectuer des tests d'adhésion aux laminines chez les cellules HIEC surexprimant les sous-unités $\beta4A$ et $\beta4Actd-$.

II–MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 Culture cellulaire

1.1 Cellules HIEC-6

La lignée cellulaire HIEC-6 a été générée dans notre laboratoire à partir d'un intestin grêle normal foetal humain, tel que décrit par Perrault et par Beaulieu en 1996. Les cellules ont été cultivées dans du milieu Optimem 1 (Gibco BRL, Rockville,MD) contenant 4% (v/v) de sérum de veau foetal (FBS) (ICN Biomedicals, Aurora, OH), 2mM de glutamine (Gibco BRL), 10mM HEPES (Gibco BRL) et 5 ng/ml d'EGFh (BD Biosciences, Bedford, MA), à 37°C dans une atmosphère à 95% air et 5% CO₂. Le milieu a été changé aux 48 heures et les cellules ont été réensemencées un dans trois à l'atteinte de la confluence.

1.2 Cellules Caco-2/15

La lignée cellulaire Caco-2/15 est un clone de la lignée parentale Caco-2 (Beaulieu et Quaroni, 1991) (HTB27, American Type Culture Collection, Rockville, MD). Les cellules de cette lignée ont la capacités d'entamer un processus de différenciation à l'atteinte de la confluence, processus qui mènera ces cellules à l'expression de marqueurs de différenciations. Ces cellules ont été cultivées dans du DMEM (Gibco BRL, Burlington, Ont.) contenant 10% (v/v)

FBS (ICN Biomedicals, Aurora, OH), 4 mM de glutamine (Gibco BRL) et 20mM HEPES (Gibco BRL), à 37°C dans une atmosphère à 95% air et 5% CO₂. Le milieu a été changé aux 48 heures et les cellules ont été réensemencées un dans cinq avant l'atteinte de la confluence.

2 Immunofluorescence indirecte

2.1 Cellules

Quarante-huit heures avant l'immunofluorescence indirecte, les cellules ont été ensemencées sur des lames multichamps (Lab-Tek, Nalge Nunc International, Naperville, IL).

2.2 Procédure d'immunofluorescence indirecte

Les cellules ont été fixées pendant 10 minutes à -20°C dans le méthanol 100%, ou 60 minutes à 4°C dans la paraformaldéhyde 2%/PBS 1X (0.137mMNaCl, 2.7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄ anhyd., 1,5 mM KH₂; pH 7,4). Pour les anticorps dirigés contre des épitopes intracellulaires, une perméabilisation de 10 minutes dans une solution de 0.5% tween/PBS 1X était réalisé (tableau 1) et suivie d'un lavage au PBS 1X. Les cellules étaient par la suite incubées 45 minutes à 4°C dans une solution 100 mM glycine/PBS 1X, 30 minutes dans une

solution 5% lait en poudre écrémé (blotto 5% ; Johnson et al., 1984)/PBS 1X, et enfin une heure dans une solution contenant un des différents anticorps primaires (tableau 1) dilué 1/100 dans le blotto 5%. Après trois lavages au PBS 1X, les cellules étaient incubées 45 minutes en présence de l'anticorps secondaire conjugué à la fluorescéine (KPL, Gaithersburg, MA) (Tableau 1), diluée 1/25 dans le blotto 5%. Après trois autres lavages au PBS 1X, les noyaux des cellules étaient colorés cinq minutes dans une solution de DAPI diluée 1:100 000 (Sigma, St-Louis, MO) dans le PBS. Par la suite, les cellules étaient colorées pendant 30 secondes dans une solution 1% Bleu Evan/PBS 1X. Pour terminer, après trois lavages au PBS 1X, les lames étaient préparées pour l'observation dans une solution de glycérol/PBS 1X (9:1) contenant 0.1% de phénylènediamine et observées à l'aide d'un microscope à fluorescence Reichert polyvar 2 (Leica Instrument, Autriche).

3 Analyse de protéines par immunobuvardage

3.1 Préparation des protéines cellulaires

Dans chaque pétri (100mm) contenant les cellules préalablement rincées aux PBS 1X, 200µl de tampon de solubilisation Laemmli 1x (tampon tris-HCl 0.125M pH 6,8; 0.23% de glycérol; 0.001% de bleu de bromophénol; 5% de β -mercaptoéthanol) étaient ajoutés. Les cellules étaient grattées et récupérées dans le tampon de solubilisation. Chacun des échantillons était ensuite soniqué

Tableau 1. Anticorps utilisés pour les immunofluorescences indirectes

Anticorps primaire					
Anticorps	Type Espèce	Protéine reconnue	Fixation	Perméabilisation	Source
MAB1964 (3E1)	Monoclonal Souris	β 4 Humain	Méthanol	Non	Chemicon Int. Temucula, CA
I86220	Monoclonal Souris	β 4 Humain	Formaldéhyde	Oui	Transduction Laboratories
SC-7392	Monoclonal Souris	HA	Formaldéhyde	Oui	Santa Cruz Biotech.
Anticorps secondaire					
Anticorps	Type Reconnue		Méthode de Révélation		Source
Anti-Mouse-FITC	IgG Souris		FITC		Caltag Laboratories Burlingame, CA

pendant 10 secondes à intensité moyenne, puis chauffé à 95°C pendant 5 minutes. Les lysats cellulaires ont été conservés à -20°C.

3.2 Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant

Suite aux dosages de protéines selon la méthode modifiée de Lowry (Peterson G.L., 1977), 150µg de protéines étaient utilisés pour chaque échantillon. Les gels séparateurs utilisés étaient de type Thomas-Kornberg (Thomas, Kornberg, 1975) et contenaient 10% d'acrylamide /bisacrylamide 30:0,15 (Bio-Rad), 0.75M de tris-HCl pH8.8 et 1% de SDS. Les gels d'entassement utilisés contenaient 4% d'acrylamide/bisacrylamide 29:1, 0.25M tris-HCl pH6.8 et 1% de SDS. Le tampon utilisé durant l'électrophorèse contenait 0.61% tris-HCl, 0.1% SDS et 2.88% glycine dans de l'eau bidistillée. La séparation des protéines était effectuée pendant 16 heures à 60 volts.

3.3 Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Les gels étaient équilibrés 30 minutes dans du tampon de transfert contenant 1,4% de glycine et 0.3% de Tris en solution dans de l'eau bidistillée. Ils étaient ensuite placés avec une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca) entre deux papiers Whatman (Whatman international

ltd, Maidstone, England), puis, dans le support Bio-Rad entre deux éponges. Les transferts étaient effectués dans un système Bio-Rad pendant 30 minutes à 20 volts, puis, 90 minutes à 100 volts. L'efficacité du transfert était vérifiée par coloration de la membrane au rouge de Ponceau 0.2% (Sigma). Les membranes étaient ensuite décolorées pendant 10 minutes dans du PBS 1X.

3.4 Détection des antigènes

La partie de la membrane de nitrocellulose contenant les protéines d'intérêt était saturée en protéines (blocage) pendant une heure dans une solution contenant 5% de blotto et 0.2% de tween 20 (Bio-Rad). Elle était par la suite incubée pour une période de 16 heures à 4°C en présence de l'anticorps primaire (tableau 2) dilué dans la solution de blocage. Après quatre lavages de 10 minutes au PBS 1X, la membrane était de nouveau bloquée pendant une heure, puis incubée avec l'anticorps secondaire 1/1000 (tableau 2) dans la même solution de blocage. La membrane était ensuite lavée à quatre reprises au PBS 1X et révélée à l'aide de l'Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate kit (Bio-Rad) ou du ECL Western Blotting Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England), selon la nature de l'anticorps secondaire (tableau 2) ou les besoins spécifiques de la méthode.

Tableau 2. Anticorps utilisés pour les immunobuvardages (western blot)

Anticorps primaires				
Anticorps	Type Espèce	Protéine reconnue	Dilution	Source
I86220	Monoclonal Souris	$\beta 4$ Humain	1/250	Transduction Laboratories
Anti- $\beta 4$ Actd	Polyclonal Lapin	$\beta 4$ Humain	1/1000	Dr E.Ruoslahti
SC-7392	Monoclonal Souris	HA Humain	1/250	Santa Cruz Biotech.
mAB13	Monoclonal Rat	$\beta 1$ Humain	1/250	Dr S.K. Akiyama
Anticorps secondaires				
Anticorps	Type Reconnue	Méthode de Révélation	Source	
Anti-Rat-AP	IgG Rat	Alkaline Phosphatase	Caltag Laboratories	
Anti-Mouse-HRP	IgG Souris	Chemiluminescence	Amersham Pharmacia Biotech.	
Anti-Rabbit-HRP	IgG Lapin	Chemiluminescence	Amersham Pharmacia Biotech.	

4 Tests d'adhésion cellulaire

4.1 Préparation des plaques de 96 puits

Les tests ont été effectués dans des plaques de 96 puits (Sarstedt, St-Léonard, Qc). Le collagène (0.25 µg/µl) et les laminines (laminine-1, 10µg/ml ; laminine-2 ; 2µg/ml ; laminine-10, 5µg/ml) étaient solubilisés dans l'acide acétique 0.02N (le collagène) ou le PBS 1X (les laminines), puis étaient déposés dans les puits (200µl/puits). Les plaques étaient ensuite laissées à 4°C pour 18 à 20 heures afin de laisser la matrice adsorber au plastique. Après deux lavages au PBS 1X, les puits étaient bloqués pendant deux heures à 37°C dans une solution BSA 2% diluée dans du PBS 1X. Les puits étaient de nouveau lavés et il y était ajouté subséquemment 100 µl de milieu OptiMEM I, contenant 0.5% BSA, 2mM glutamine, 10mM HEPES, 0.3mM Mn²⁺ et 10 ng/ml de EGF (OptiMEM 0.5% BSA) dans chacun des puits.

4.2 Préparation, récupération et ensemencement des cellules

Les cellules HIEC étaient sevrées dans du milieu OptiMEM 0.5% BSA, de cinq à six heures avant d'être passées un dans un, ceci afin de faciliter leur récupération 16 à 18 heures plus tard. Ces cellules étaient récupérées avec 1ml de PBS 1X contenant 0.5mM EDTA, et ensuite centrifugées à 100g pendant cinq minutes. Les cellules étaient resuspendues, comptées et laissées en attente une

heure (Frisch et Francis, 1994). Subséquemment, 50 000 cellules par puits étaient ensemencées et les plaques étaient placées dans un incubateur à 37°C, 95% air et 5% CO₂. Après 30 minutes, les anticorps bloquants étaient ajoutés (si nécessaire) (Voir tableau 3), et enfin, les plaques étaient remises dans l'incubateur pour deux heures.

Tableau 3. Anticorps bloquants utilisés pour les tests d'adhésion

Anticorps primaires				
Anticorps	Type Espèce	Protéine reconnue	Concentration	Source
mAB13	Monoclonal Rat	β 1 Humain	10 μ g/ml	Dr S.K. Akiyama
GoH3	Monoclonal Souris	α 6 Humain	10 μ g/ml	Pharmingen

4.3 Quantification des cellules adhérees par colorimétrie

Une méthode de lecture par colorimétrie à été utilisée pour estimer le nombre de cellules adhérees dans chaque puits. Les plaques ont donc été immergées et agitées dans du PBS 1X, selon un mouvement de va et viens afin d'éliminer les cellules non-adhérees. Par la suite, à chaque puits, 100 μ l de PBS

1X étaient retirés, puis 100µl de formaldéhyde 7.4% dans du PBS 1X étaient ajoutés. Les plaques étaient ensuite placées à 4°C pendant 25 minutes afin de fixer les cellules. Après deux lavages au PBS 1X, les cellules étaient incubées pendant 10 minutes à température pièce dans 150µl d'une solution de 1% cristal violet dissout dans le méthanol. Les puits étaient rincés en plaçant le dos des plaques sous le jet du robinet. Les cellules étaient lysées dans 200µl/puits d'une solution de 2% SDS dans du PBS 1X. L'absorbance était déterminée à 595nm à l'aide d'un lecteur de plaque de 96 puits (Bio-Rad).

5 Préparation de l'ADNc de β 4Actd- et du vecteur d'expression

5.1 Insertion du fragment Xba I-Not I de β 4A dans pBluescript

La construction pRCCMV/ β 4A qui contient l'ADNc codant pour la sous-unité β 4A est un don du Dr Arnoud Sonnenberg (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Hollande). En vue de la mutagenèse dirigée, un fragment de 1060 paires de bases (pb) correspondant à la partie 3' de l'ADNc codant pour β 4A à été sous-cloné du vecteur pRCCMV/ β 4A dans le vecteur pBluescript II ks en utilisant les enzymes de restriction Xba I (Boehringer, Mannheim) et Not I (Boehringer, Mannheim) conformément aux recommandations du fabricant (figure 7A). D'abord, 10µg d'ADN de la construction ont été co-traités dans un volume total de 100 µl comprenant : 50 unités de l'enzyme Xba I et 50 unités de l'enzyme Not I, pendant trois heures à 37°C. Le fragment de 1060 pb a

ultérieurement été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose. L'ADN correspondant à l'ADNc de $\beta 4A$ a été extrait du gel par une électroélution : Après avoir repéré la bande d'ADN grâce à un trans-illuminateur (IBI ultra linker 400, Eastman Chemical Company, Kingsport, TN), la partie du gel correspondante a été découpée et placée dans un boudin à dialyse. Quatre cent cinquante μ l de tampon de migration TBE (90 mM Tris-Borate, 2 mM EDTA) ont ensuite été ajoutés, puis l'ADN a été électroélué pendant 30 minutes à 100 volts. Le tampon TBE contenant maintenant l'ADN a été recueilli et transféré du boudin à un eppendorf. Par la suite, un volume de phénol saturé pH 8 a été ajouté au tampon, vortexé et centrifugé cinq minutes à 13 000g. La phase aqueuse a été recueillie et un volume de chloroforme fut ajouté, vortexé et centrifugée de nouveau. L'ADN contenu dans la phase aqueuse a ensuite été précipité par une centrifugation à 4 °C de 30 minutes à 13 000g avec 1/10 volume d'acétate de sodium 3M et trois volumes d'éthanol 100% froid. Le culot d'ADN a par la suite été lavé à l'éthanol 70% et resuspendu dans 10 μ l de tris-HCl 10 mM pH 7.5. Parallèlement, le vecteur pBluescript a été co-traité avec les enzymes Xba I et Not I afin de créer des fragments complémentaires pour l'insertion du fragment d'ADN de 1060 pb (figure 7A). Pour diminuer les chances que le vecteur ne se referme sur lui-même durant la ligation, il avait été préalablement déphosphorylé par la phosphatase alcaline (Boehringer, Mannheim). Ensuite, le fragment de 1060 pb a été inséré dans pBluescript grâce à une ligation des extrémités cohésives du fragment et du vecteur par l'enzyme ADN ligase T4(Gibco BRL)

conformément aux recommandations du fabricant. Ainsi nous avons donc obtenu le vecteur pBluescript/β4A Not I- Xba I (figure 7A).

5.2 Création du β4Actd-HA par mutagenèse à partir du fragment β4A Not I-Xba I

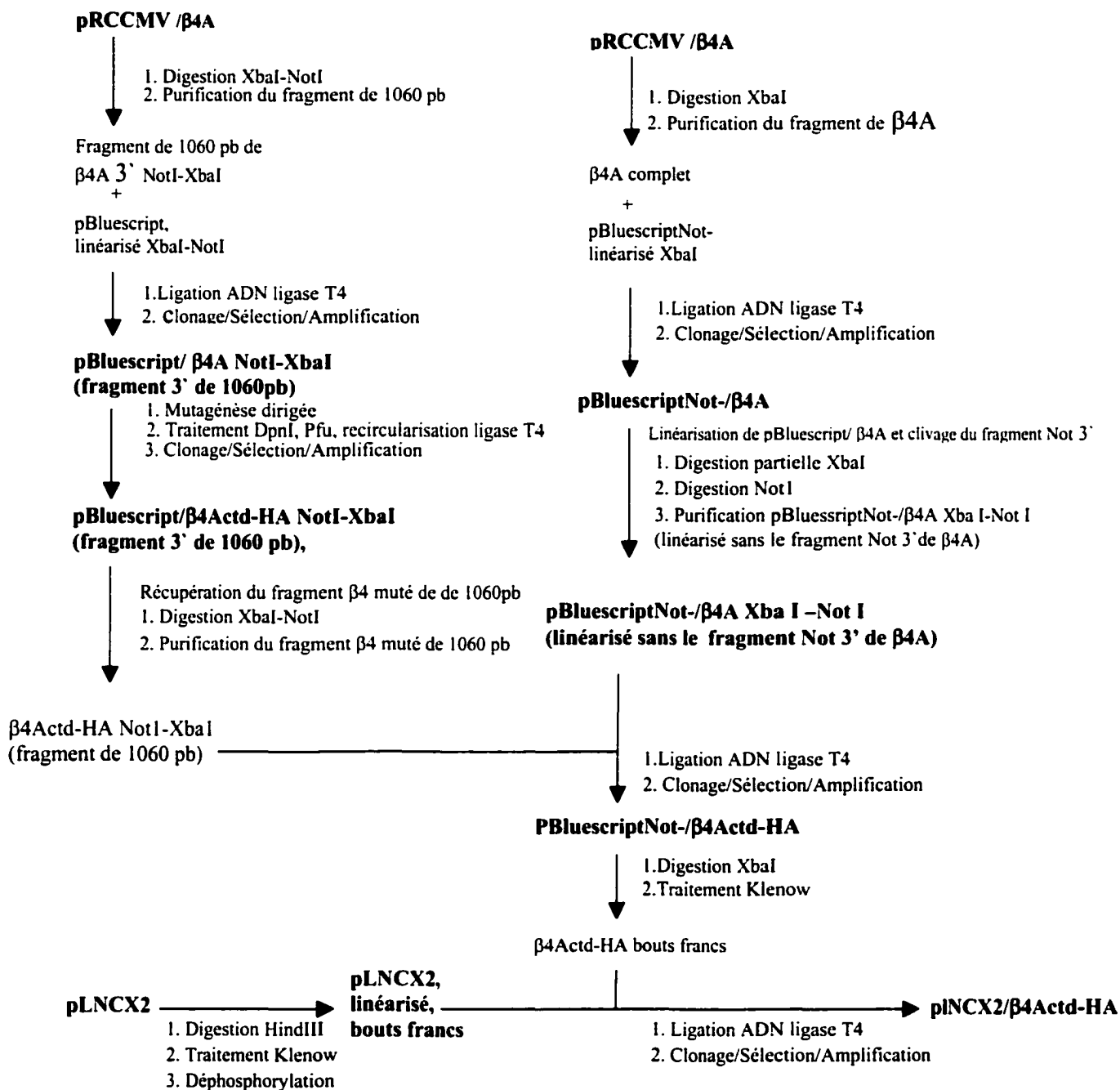
Les bases codant pour les 31 derniers acides aminés du domaine cytoplasmique de β4A ont été enlevées et remplacées par un marqueur HA en utilisant le ExSite PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) sur le gène du β4A pour former le β4Actd-HA. Pour utiliser cette trousse, des amorces spéciales conçues pour produire la mutation désirée lors de la réaction de PCR ont été obtenues chez Gibco BRL (Voir tableau 4). Ces amorces ont été utilisées lors d'un PCR ou le mélange spécial de polymérase ExSite (Stratagene) a amplifié la construction pBluescript/β4A Not I-Xba I en y incluant la mutation codée par ces amorces spéciales pour créer le pBluescript/β4Actd-HA Not I-Xba I. Pour la réaction, 1.5μg de notre construction pBluescript/β4A Not I-Xba I, 180 ng de l'amorce mut-β4-1 et 310 ng de l'amorce mut-β4-2 (5ng/base) ont été ajoutées à un mélange contenant 2.5 μl de tampon de mutagenèse 10x, 1 μl de mélange de dNTP 25mM et 15.5 μl d'eau nano-pure. Ensuite, 1μl (5 unités) du mélange spécial d'ADN polymérase ExSite (Stratagene) a été ajouté au mélange juste avant d'amorcer le PCR. Suite à la réaction, 10 unités de l'enzyme de restriction Dpn I qui digère l'ADN méthylé

Figure 7. Schémas des étapes ayant menées aux constructions pLNCX2/β4A et pLNCX2/β4Actd- HA

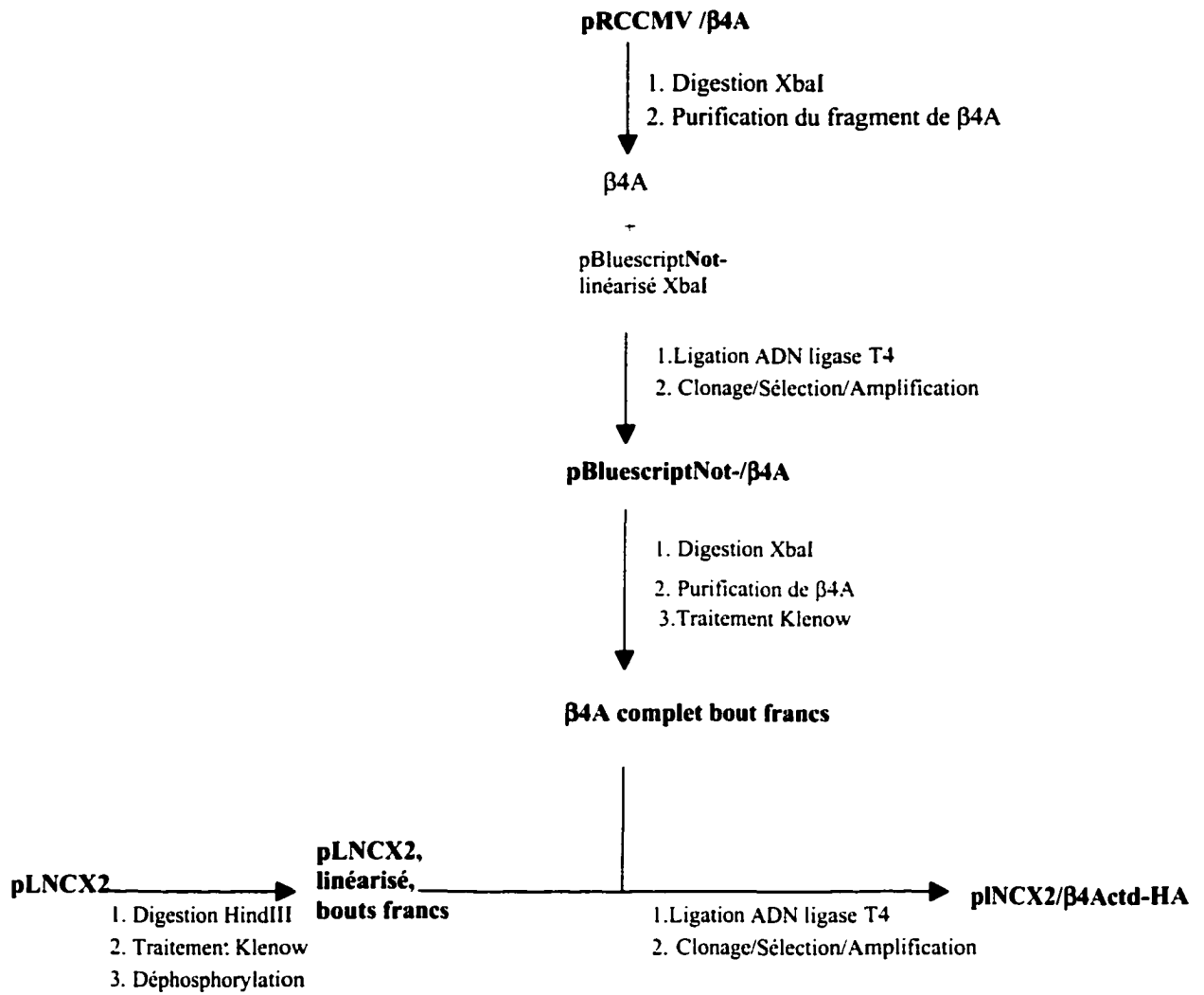
A Le fragment Xba I-Not I de 1060 pb de l'extrémité 3' de β4A a été extrait de la construction pRCCMV/β4A et cloné dans le vecteur pBluescript. Ce fragment a été par la suite muté par mutagenèse dirigée. Parallèlement, l'ADNc complet de la sous-unité β4A a été extrait de pRCCMV et cloné dans un vecteur pBluescript ne contenant pas de site Not I (pBluescriptNot-). Suite à une digestion partielle Xba I suivit d'une digestion complète Not I, le vecteur pBluescriptNot- contenant l'ADNc β4A Xba I-Not I sans les 1060 pb 3' de β4A (pBluescriptNot-/β4A Xba I-Not I) a été purifié sur gel par électrophorèse. Le fragment muté de 1060 pb a subséquemment été réinséré à l'extrémité à cette construction de sorte que nous obtenions la construction pBluescriptNot-/β4Actd-HA. L'ADNc de β4Actd-HA a ensuite été transféré au vecteur d'expression pLNCX2.

B L'ADNc complet de la sous-unité β4A a été extrait de pRCCMV et cloné dans un vecteur pBluescript ne contenant pas de site Not I (pBluescriptNot-). L'ADNc de β4A a ensuite été transféré au vecteur d'expression pLNCX2.

A



B



(ADN de départ et ADN hybrides) et 2.5 unités de la polymérase Pfu qui remplit les extrémités d'ADN simple brin (laissée par la polymérase ExSite) ont été ajoutés au mélange. Ensuite, le mélange a été réincubé pendant 30 minutes à 37°C, puis, 30 minutes à 72°C. Après les incubations, le mélange contenait majoritairement de l'ADN linéaire ayant incorporé la mutation. L'ADN a été recircularisé avec l'ADN ligase T4 (GibcoBRL) durant une heure à 37°C. Ultérieurement, 2 µl du produit de ligation ont été utilisés pour transformer 50 µl de bactéries électro-compétentes E.Coli DH5α par électroporation (1,8 kV). Immédiatement après, 900µl de milieu SOC (2% bactotryptone, 0.5% extrait de levure, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM Mg SO₄ et 20 mM glucose) ont été ajoutés aux bactéries et elles ont ensuite été incubées sous agitation pendant 45 minutes à 37°C. Les bactéries ont subséquemment été ensemencées dans un pétri de 100 mm contenant 10 ml de L-Broth-Agar/ampicilline (0.1g/ml) et incubées pendant 16 heures à 37°C. Les colonies isolées ont été amplifiées sous agitation pendant un autre 16 heures à 37°C dans 5 ml de milieu LB-Ampicilline (0.1g/ml). L'ADN des colonies isolées a été extrait à l'aide du Mini-prep DNA Extraction Kit (Quiagen). Les clones comportant la construction pBluescript/β4Actd-HA Not I-Xba I (figure 7A) ont été identifiés par digestion avec les enzymes de restriction Not I et Nde I (le site Nde I a été généré avec la mutation et n'est donc pas présent dans le pBluescript/β4A Not I-Xba I), et amplifiés dans 300 ml de milieu L-Broth-Ampicilline (0.1g/ml). Les constructions

ont été récupérées des bactéries avec le Maxi-prep DNA Extraction Kit (Qiagen) et subséquemment séquencé afin de confirmer la présence de la mutation (figure 9).

Tableau 4. Amorces utilisées dans la mutagenèse dirigée

Amorces	Séquences (5' vers 3')
Mut-β4-1	p-GAG GGA GCC GCC TGC CTC CAG GTG CTG GGC CCC CAG
Mut-β4-2	p-TAT CCA TAT GAT GTT CCA GAT TAT GCT AAT GGG GCC TGA CCG CAC CCT GCC CCA CCC CCG CC

5.3 Insertion du fragment β4A Xba I-Not I muté (β4Actd-HA Not I- Xba I) au domaine cytoplasmique de β4

La construction pBluescriptNot-/β4A a été produite en extrayant l'ADNc de β4A de pRCCMV avec l'enzyme de restriction Xba I, puis en ligant cette ADNc avec l'ADN ligase T4 dans le pBluescriptNot- préalablement linéarisé avec Xba I (figure 7B). Le vecteur pBluescriptNot- est le vecteur pBluescript modifié duquel

on a retiré le site de restriction Not I. Le pBluescriptNot-/β4A a par la suite été partiellement digéré par l'enzyme Xba I de manière à ce que la majorité de l'ADN ne soit seulement coupée qu'à l'un des deux sites Xba I. Après avoir fait une extraction phénol/chloroforme et une précipitation à l'éthanol, l'ADN linéaire a été re-digéré complètement par l'enzyme Not I. Ainsi nous nous retrouvons avec de l'ADN linéaire ayant le pBluescriptNot- avec soit les premiers 4.5 kb de β4A ou les dernières 1060 pb de β4A. La construction linéarisée pBluescriptNot-/β4A Xba I-Not I (figure 7A) migrant à 7.5 kb (comprenant le pBluescriptNot- et le β4a Xba I-Not I sans le fragment not 3' de 1060pb de β4A) sur gel d'agarose a par la suite été extrait du gel par une électroélution. Parallèlement, le fragment d'ADN Not I-Xba I muté a été extrait du vecteur pBluescript/β4A Not I-Xba I. Il a ensuite été séparé sur gel d'agarose et extrait par électroélution. Deux ug de cet ADN et 0.5 ug de la construction linéarisée pBluescriptNot-/β4A Xba I-Not I de 7.5 kb ont été liés avec la T4 DNA ligase. 50 µl de bactéries E.Coli DH5α électro-compétentes ont été par la suite transformées par électroporation avec 2µl de l'ADN obtenu du produit de ligation, puis, amplifiées dans du milieu L-Broth-Ampicilline (0.1g/ml). Les bactéries ont subséquemment étéensemencées dans un pétri de 100 mm contenant 10 ml de L-Broth-Agar/ampicilline (0.1g/ml) et incubées pendant 16 heures à 37°C. Les colonies isolées ont été amplifiées sous agitation pendant un autre 16 heures à 37°C dans 5 ml de milieu LB-Ampicilline (0.1g/ml). L'ADN des colonies isolées a été extrait à l'aide du Mini-prep DNA Extraction Kit (Quiagen). Les clones comportant la construction pBluescriptNot-/β4Actd-HA ont été identifiés par digestion avec les enzymes de

restriction Not I et Nde I (le site Nde I a été généré avec la mutation), et amplifiés dans 300 ml de milieu L-Broth-Ampciline (0.1g/ml). L'ADN pBluescript/ β 4Actd-HA a été récupéré des bactéries avec le Maxi-Prep DNA Extraction Kit (Quiagen).

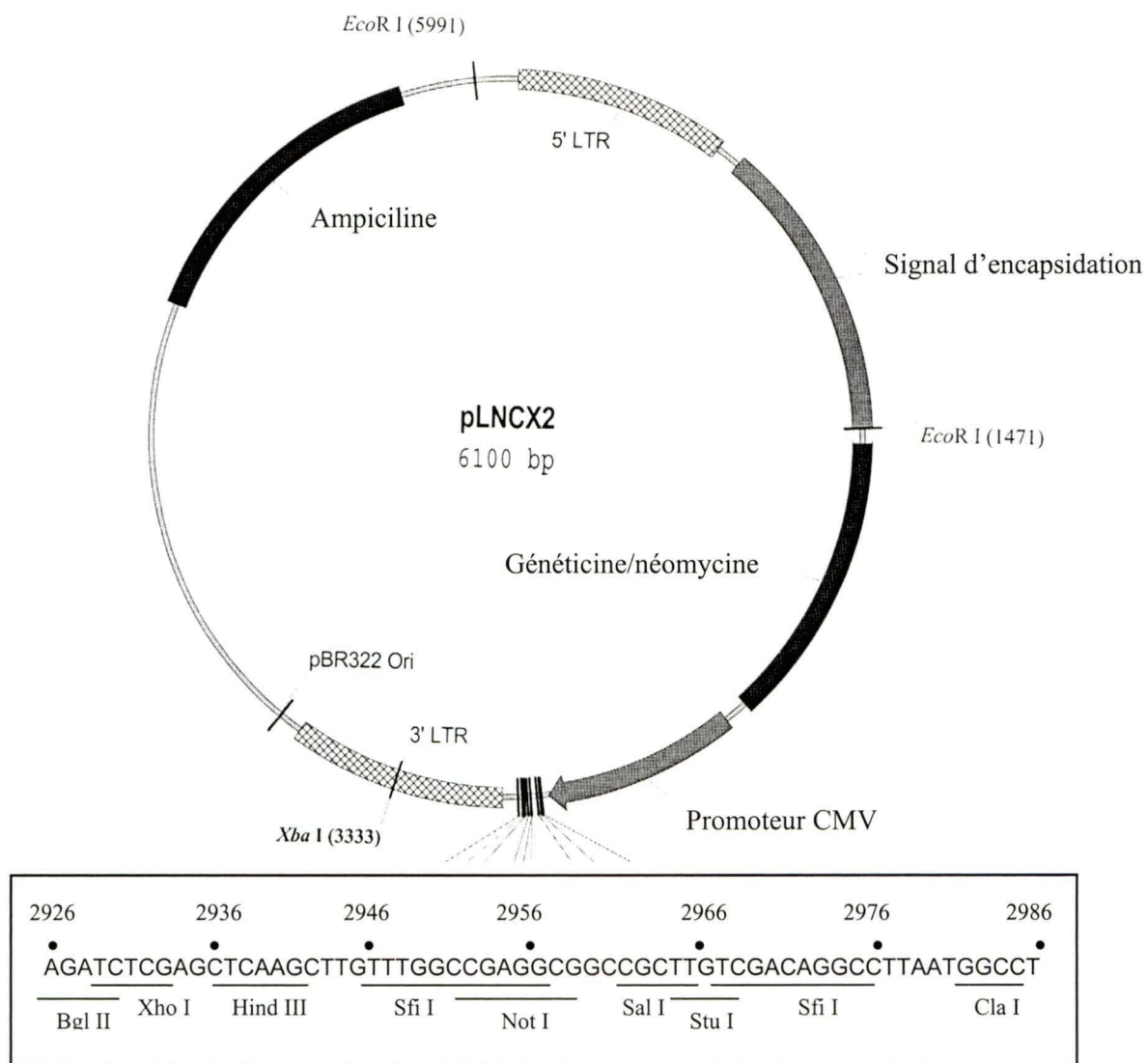
6 Fabrication des constructions pLNCX2/ β 4A et pLNCX2/ β 4Actd-

6.1 Préparation de l'ADNc de β 4A et de β 4Actd-HA pour l'insertion dans pLNCX2

Une digestion enzymatique a été effectuée sur les constructions pBluescriptNot-/ β 4A et pBluescriptNot-/ β 4Actd-HA afin d'en extraire le β 4A et le β 4Actd-HA (figure 7A et 7B). Donc 10 μ g d'ADN de chacune des deux constructions ont été digérés avec l'enzyme de restriction Xba I pendant trois heures à 37°C. Le produit de digestion a ensuite été séparé par migration sur gel d'agarose. L'ADN correspondant aux ADNc de β 4A et de β 4Actd-HA ont été extraits du gel par électroélution. Ils ont ensuite été resuspendus dans 20 μ l de tris-HCl 10 mM pH 7.5

Figure 8. Carte du vecteur d'expression pLNCX2

Le vecteur d'expression pLNCX2 possède un site de clonages multiples sous le contrôle du promoteur CMV. Le gène de résistance généticine est sous le contrôle du promoteur LTR.



Site de clonages multiples

6.2 Préparation du vecteur pLNCX2

Afin de linéariser le vecteur d'expression pLNCX2, 5 μ g d'ADN ont été coupés dans la cassette de clonage du vecteur au site unique de restriction Hind III (Boehringer, Mannheim) (figure 8). L'ADN a ensuite été soumis à une extraction phénol/chloroforme et précipité avec de l'éthanol 100 % puis resuspendu dans 10 μ l de tris-HCl 10 mM pH 7.5

6.3 Insertion de β 4A et de β 4Actd-HA dans pLNCX2

Comme les extrémités de nos brins d'ADN coupés avec Xba I pour β 4A et β 4Actd-HA et Hind III pour notre vecteur pLNCX2 ne sont pas complémentaires, un remplissage de nos extrémités cohésives par l'enzyme Klenow (Boehringer, Mannheim) a été nécessaire. Pour diminuer les chances que le vecteur ne se referme sur lui-même durant les ligations, le vecteur a été déphosphorylé par la phosphatase alcaline (Boehringer, Mannheim). Ensuite, pour chacune des deux ligations (β 4A et pLNCX2, β 4Actd-HA et pLNCX2), 2 μ g de l'ADNc de β 4A et de β 4Actd-HA ont été utilisés pour 0.5 μ g de pLNCX2. Pour les deux ligations une unité de l'ADN ligase T4 (Gibco BRL) et 1 μ l de son tampon ont été ajoutés, puis les volumes ont été complétés à 10 μ l avec de l'eau. Les ligations ont eu lieu pendant 16 heures à température pièce. Ensuite, 2 μ l de chaque produit de ligation a été utilisé pour transformer 50 μ l de bactéries électrocompétentes

E.Coli DH5 α chacun. Les bactéries transformées ont été amplifiées séparément dans 5 ml de milieu LB-Ampiciline (0.1g/ml) sous agitation pendant 16 heures à 37°C. Les bouillons de bactéries obtenus ont subséquemment été ensemencés séparément dans des pétris de 100 mm contenant 10 ml de L-Broth-Agar/ampicilline (0.1g/ml) et incubés pendant 16 heures à 37°C. Les colonies isolées ont été amplifiées sous agitation pendant un autre 16 heures à 37°C dans 5 ml de milieu LB-Ampiciline (0.1g/ml). L'ADN des colonies isolées a été extrait à l'aide du Mini-prep DNA Extraction Kit (Quiagen). Les clones comportant la construction pLNCX2/ β 4Actd-HA (figure 7A) ont été identifiés par digestion avec les enzymes de restriction Not I et Nde I (le site Nde I a été généré avec la mutation). Les clones comportant la construction pLNCX2/ β 4A (figure 7B) ont été identifiés par digestion avec les enzymes de restriction Not I et Cla I. Les clones comportant les bonnes constructions ont été amplifiés dans 300 ml de milieu L-Broth-Ampicilline (0.1g/ml). L'ADN des constructions ont été récupérés des bactéries avec le Maxi-Prep DNA Extraction Kit (Quiagen).

7 Infection rétrovirales des cellules HIEC

7.1 Préparation des virus et infection des cellules

Vingt μ g des constructions pLNCX2/ β 4A ou pLNCX2/ β 4Actd-HA ont été co-transfectées avec 20 μ g de pAmpho (vecteur comportant les gènes nécessaires à la formation des capsides rétrovirales) en utilisant la méthode de

phosphate de calcium (Colbere-Garapin et Garapin, 1983 ; Chen et Okayama., 1988) dans des pétris de 35 mm contenant des cellules 293T. Le vecteur pAmpho et les cellules 293T sont un don du Dr Alain Nepveu (Department of Medicine, McGill University). Les milieux ont été changés le lendemain, puis les surnageants contenant les particules virales ont été recueillis et concentrés dans un volume de 0.5 ml par une centrifugation de 30 minutes à 2000g avec le UltraFree 15 Centrifuge Filter device (Biomax, Millipore Corporation, Bedford, MA). 24 heures après avoir passé les cellules HIEC dans des pétris de 35 mm, elles ont été incubées pendant une heure dans la solution contenant les virus et 4 ug/ml de polybrène (Sigma). Le polybrène modifie les charges électriques à la surface des cellules afin de faciliter l'infection des virus. Par la suite, les milieux ont été remplacés par 2 ml de milieu frais par pétris. Deux jours plus tard, une sélection à la généticine (Gibco BRL) à une concentration de 0.25µg/ml a été appliquée sur les cellules infectées avec nos constructions et sur des cellules contrôles non-infectées.

III-Résultats

1. Génération de la construction mutante $\beta 4\text{Actd-HA}$

Les cellules HIEC expriment normalement une faible quantité de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ sous la forme $\alpha 6\beta 4\text{Actd-}$ (Basora et al., 1999). Notre premier objectif consistait à surexprimer la sous-unité $\beta 4\text{A}$ complète et la sous-unité $\beta 4\text{Actd-}$ tronquée chez ces cellules. Cependant, nous ne possédions que l'ADNc codant pour la sous-unité $\beta 4\text{A}$ complète. Nous avons donc créé par mutagenèse dirigée, à partir de l'ADNc de la sous-unité $\beta 4\text{A}$ complète, un ADNc codant pour la sous-unité $\beta 4\text{Actd-}$. Un marqueur HA a également été ajouté à cet ADNc pour produire la construction $\beta 4\text{Actd-HA}$. L'ajout du marqueur HA, provenant de la protéine hemagglutinine de l'influenza, a pour but de permettre la détection spécifique de la protéine mutante qui sera surexprimée. Ensuite, nous avons fait séquencer les extrémités 5' de nos sous-unités $\beta 4\text{A}$ et du $\beta 4\text{Actd-HA}$ obtenues afin de s'assurer qu'il n'y avait pas d'erreur dans leurs séquences. Ceci nous a permis de confirmer que la mutagenèse dirigée avait bien fonctionné et que les séquences étaient exactes (figure 9).

Figure 9. Séquences comparatives des extrémités 5' de l'ADN codant pour les sous-unités $\beta 4A$ et $\beta 4Actd-HA$

Les parties 5' des sous-unités $\beta 4A$ et $\beta 4Actd-HA$ dans pBluescript ont été séquencées à l'aide des amorces T3 et T7 s'hybridant sur le vecteur. Pour plus de clarté, seulement les bases des extrémités 5' des deux ADNc sont présentées. Les amorces Mut- $\beta 4-1$ et Mut-B4-2 ayant servi pour la mutagenèse dirigée sont représentées respectivement en gras et en italique (*ex* : ***CGAT***), et en gras seulement (*ex* : **CGAT**). Les acides aminés codant pour le marqueur HA faisant partie de l'amorce Mut- $\beta 4-1$ sont en gras et italique et en police CALISTO MT (*ex* : ***CGAT***). Les codons arrêts sont soulignés.

Séquence 5' β4A : TTC CTA GTG GAT GGG CCG ACC CTG

Séquence 5' β4Actd-HA : TTC CTA GTG GAT GGG CCG ACC **CTG**

GGG GCC CAG CAC CTG GAG GCA GGC GGC TCC CTC ACC

GGG GCC CAG CAC CTG GAG GCA GGC GGC TCC CTC TAT

CGG CAT GTG ACC CAG GAG TTT GTG AGC CGG ACA CTG

CCA TAT GAT GTT CCA GAT TAT GCT AAT GGG GCC -----

ACC ACC AGC GGA ACC CTT AGC ACC CAC ATG GAC CAA

CAG TTC TTC CAA ACT TGA CCG CAC CCT GCC CCA CCC

----- **TGA** **CCG CAC CCT GCC CCA CCC**

CCG CCA.....3'

CCG CCA.....3'

2. Génération et analyse des cellules HIEC surexprimant β 4A et β 4Actd-HA

2.1 Surexpression des protéines β 4A et de β 4Actd-HA dans les cellules HIEC

La surexpression des sous-unités β 4A et β 4Actd-HA dans les cellules HIEC n'a pas été facile. Nous avons d'abord tenté de transfecter de façon stable nos ADNc dans les cellules avec le vecteur d'expression pBabe (Morgenstern et Land., 1990). Cependant, avec cette technique et ce vecteur nous obtenions des cellules HIEC résistantes aux antibiotiques mais ne surexprimant pas β 4A et β 4Actd-HA. Les mêmes résultats ont été obtenus avec le vecteur d'expression pBabeCMV qui est le vecteur pBabe auquel nous avons ajouté le promoteur fort CMV avant le promoteur LTR. Ces résultats suggèrent qu'il y avait possiblement un problème au niveau de l'intégration de nos ADNc au génome cellulaire. En effet, les probabilités que les constructions s'intègrent correctement au génome des cellules sont beaucoup diminuées en raison de la longueur même des ADNc de β 4A et de β 4Actd-HA (5.6kb) (Colosimo et al., 2000; Yoshikawa, 2001).

Les ADNc de β 4A et β 4Actd-HA ont ensuite été insérés dans le vecteur d'expression pLNCX2 (figure 8), puis ces constructions ont été utilisées lors d'infections rétrovirales chez des cellules HIEC. Cette méthode nous a finalement permis une surexpression stable des protéines désirées (Yee et al., 1994; Colosimo et al., 2000). Ensuite, nous avons étudié la surexpression de la sous-unité β 4A chez les cellules HIEC infectées avec la construction pLNCX2/ β 4A (HIEC β 4A) et la surexpression de la sous-unité β 4Actd-HA chez les

cellules HIEC infectées avec la construction pLNCX2/ β 4Actd-HA (HIEC β 4Actd-HA). Nous avons également comparé ces cellules avec les cellules HIEC infectées avec le vecteur pLNCX2 vide (HIECV) n'exprimant aucune protéine exogène.

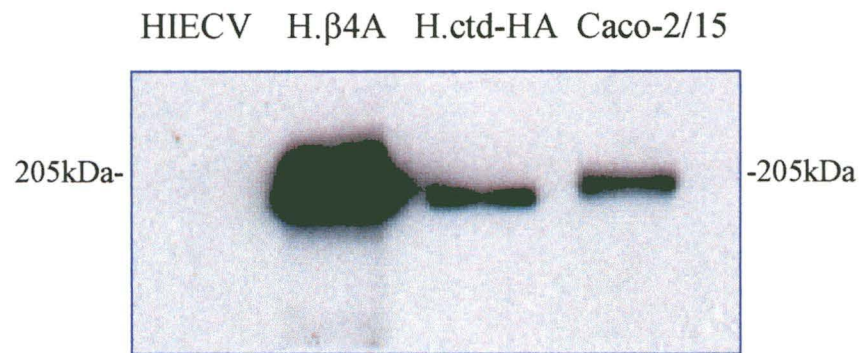
2.2 Surexpression stable de β 4A chez les cellules infectées avec le pLNCX2/ β 4A

Dans un premier temps, nous avons analysé par immunobuvardage de type Western (Western Blot) l'expression de la sous-unité β 4A chez les cellules HIEC β 4A. La détection de β 4A a été effectuée avec l'anticorps I86220 dirigé contre la partie C-terminale du domaine cytoplasmique de β 4, mais non contre ses 31 derniers acides aminés (cet anticorps reconnaît donc β 4A, β 4Actd-HA et β 4Actd-). L'immunobuvardage montre une forte augmentation de l'expression de la sous-unité β 4A chez les HIEC β 4A, en comparaison avec l'expression de la sous-unité β 4Actd- obtenue chez les cellules contrôles HIECV (figure 10A). Il est à noter que l'intensité de détection de la protéine β 4A était telle que nous devions utiliser des temps de révélation très courts; la bande β 4A masquant les bandes des pistes adjacentes avec un temps d'exposition plus long. L'expression d' α 6 β 4Actd- étant faible chez les HIECV, ceci laisse paraître une absence de détection de β 4Actd- chez les cellules HIECV (figure 10A).

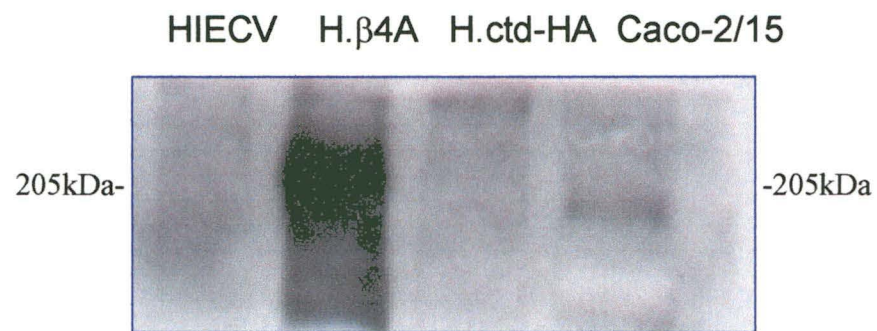
Figure 10. Analyse de la surexpression de β 4A chez les cellules HIEC β 4A

(A,B et C) Les cellules HIECV, HIEC β 4A et HIEC β 4Actd-HA ont été cultivées dans du milieu optimem additionné de 10% de sérum. Les cellules Caco-2/15 ont été cultivées dans du milieu DMEM additionné de 10% de sérum. (A et B) Les cellules HIECV, HIEC β 4A et HIEC β 4Actd-HA ont été lysées dans du tampon de Laemmli, une journée avant l'atteinte de la confluence. Les cellules Caco-2/15 ont été lysées dans du tampon de Laemmli la journée de l'atteinte de la confluence. Les lysats ont été dosés et 150 μ g de protéines de chaque échantillon ont été séparés par SDS-PAGE (12%), puis électrotransférés sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont ensuite été mises en contact avec un anticorps (A) reconnaissant la queue cytoplasmique de la sous-unité β 4 (I86220) ou (B) les 31 derniers acides aminés de l'extrémité de la queue cytoplasmique de la sous-unité β 4 (anti- β 4ctd). Les bandes ont été révélées à l'aide de la méthode de chemiluminescence. Les sous-unités β 4A et β 4Actd- et β 4Actd-HA migrent à 205 kDa. (C) Les cellules (C1) HIEC β 4A et (C2) HIECV ont été fixées, puis ont été perméabilisées. Ensuite, elles ont été incubées en présence de l'anticorps I86220 et les noyaux ont été marqués aux DAPI (points bleus). Finalement, elles ont été visualisées au microscope à fluorescence.

A

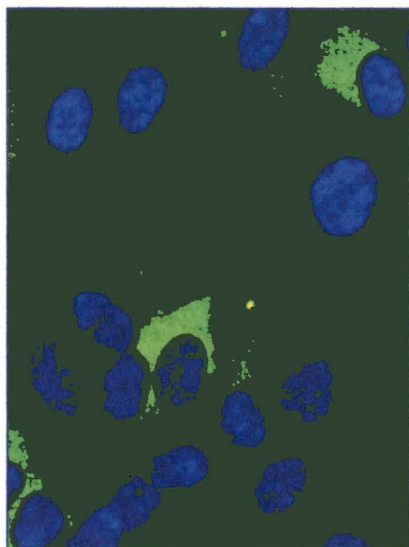


B

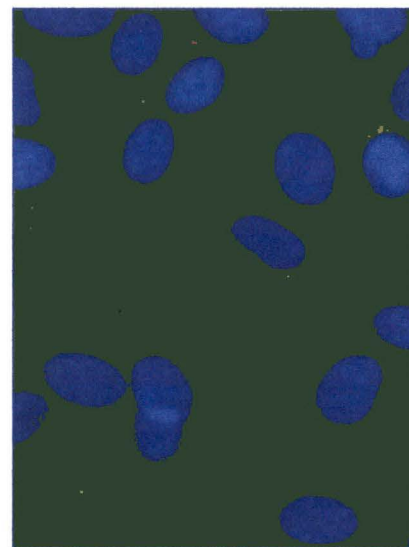


C

1. HIECβ4A



2. HIECV



Il est cependant possible de visualiser la présence d' $\alpha 6\beta 4$ Actd- chez les HIECV à la figure 12A. Nous observons également que les cellules HIEC $\beta 4A$ expriment des niveaux plus élevés de $\beta 4A$ que les cellules Caco-2/15 confluentes (figure 10A). Ceci démontre une forte surexpression de la sous-unité $\beta 4A$ chez les cellules HIEC $\beta 4A$, compte tenu que les cellules Caco-2/15 expriment normalement beaucoup plus de sous-unités $\beta 4$ que les cellules HIEC normales (Basora et al., 1999). En utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre les 31 derniers acides aminés du domaine cytoplasmique de $\beta 4$, l'anti- $\beta 4$ ctd, nous détectons toujours la sous-unité $\beta 4A$ surexprimée chez les cellules HIEC $\beta 4A$ (figure 10B). Donc, les cellules HIEC $\beta 4A$ surexpriment bel et bien la sous-unité $\beta 4A$ complète et non la sous-unité $\beta 4$ Actd-. Ceci constitue un point important, car cela indique que ces cellules ne parviennent pas à cliver la sous-unité $\beta 4A$ comme elles le font normalement (Basora et al., 1999). Ensuite, la surexpression de $\beta 4A$ chez les cellules HIEC $\beta 4A$ a été analysée par immunofluorescence indirecte avec l'anticorps I86220. Ces cellules exhibent en général un marquage très fort comparé aux cellules contrôles HIECV (figure 10C). L'expression est cependant irrégulière d'une cellule HIEC $\beta 4A$ à l'autre : en effet, certaines cellules exhibent un marquage très fort, alors que d'autres montrent un marquage plus modéré (figure 10C). Cette hétérogénéité d'expression était attendue : étant donné que nous n'avons pas cloné les cellules infectées, nous avons à faire à une population de cellules stablement infectées ayant différents niveaux d'expression.

2.3 Surexpression stable de $\beta 4$ Actd-HA chez les cellules infectées avec le pLNCX2/ $\beta 4$ Actd-HA

L'étude de la surexpression de la sous-unité $\beta 4$ Actd-HA chez les HIEC $\beta 4$ Actd-HA a également été effectuée par immunobuvardage. Premièrement, nous avons vérifié si les cellules infectées avec le pLNCX2/ $\beta 4$ Actd-HA surexprimaient bel et bien la sous-unité $\beta 4$ Actd-HA. L'anticorps SC-7392 dirigé contre le marqueur HA détecte la protéine $\beta 4$ Actd-HA chez les cellules HIEC $\beta 4$ Actd-HA, mais ne détecte aucune protéine chez les cellules Caco-2/15 (figure 11A). Ceci confirme que la sous-unité $\beta 4$ Actd-HA surexprimée possède bien le marqueur HA. De plus, l'anticorps anti- $\beta 4$ Actd ne détecte pas la sous-unité $\beta 4$ Actd-HA chez les HIEC $\beta 4$ Actd-HA, tandis que cet anticorps détecte la sous-unité $\beta 4$ A surexprimée par les cellules HIEC $\beta 4$ A et celle exprimée normalement par les cellules Caco-2/15 (figure 10B). Ceci démontre que les cellules HIEC $\beta 4$ Actd-HA surexpriment la sous-unité $\beta 4$ Actd-HA qui ne possède pas les derniers acides aminés de son extrémité C-terminale. Ces deux éléments confirment que les cellules HIEC $\beta 4$ Actd-HA surexpriment bel et bien la sous-unité $\beta 4$ Actd-HA.

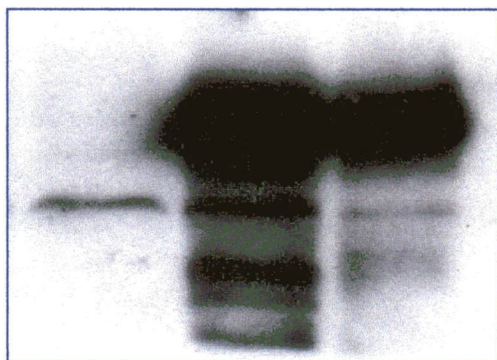
En utilisant l'anticorps I86220, on observe chez les cellules HIEC $\beta 4$ Actd-HA une forte surexpression de $\beta 4$ Actd-HA (figure 11B). Comme pour les cellules HIEC $\beta 4$ A, le niveau d'expression de la protéine dépasse largement l'expression

Figure 11 Analyse de la surexpression de $\beta 4$ Actd-HA chez les cellules HIEC $\beta 4$ Actd-HA

(A, B, C et D) Les cellules HIECV, HIEC $\beta 4$ A, HIEC $\beta 4$ Actd-HA et HIEC $\beta 4$ Actd-HA transitoire (H $\beta 4$ Actd-HA) ont été cultivées dans du milieu optimem additionné de 10% de sérum. Les cellules Caco-2/15 ont été cultivées dans du milieu DMEM additionné de 10% de sérum. (A et B) Les cellules HIECV, HIEC $\beta 4$ A et HIEC $\beta 4$ Actd-HA ont été lysées, une journée avant l'atteinte de la confluence. Les cellules HIEC $\beta 4$ Actd-HA transitoires ont été lysées dans du tampon de Laemmli 48H après leur transfection avec le vecteur $\beta 4$ Actd-HA. Les cellules Caco-2/15 ont été lysées dans du tampon de Laemmli la journée de l'atteinte de la confluence. Les lysats ont été dosés et 150 μ g de protéine de chaque échantillon ont été séparés par SDS-PAGE (12%), puis électrotransférés sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont ensuite été mises en contact avec un anticorps (A) dirigé contre le marqueur HA (SC-7392) ou (B) contre $\beta 4$ (I86220). (A) La piste HIEC $\beta 4$ Actd-HA transitoires constitue un contrôle positif pour le marqueur HA. Les bandes ont été révélées à l'aide de la méthode de chemiluminescence. Les sous-unités $\beta 4$ A et $\beta 4$ Actd- et $\beta 4$ Actd-HA migrent à 205 kDa. (C et D) Les cellules (C et D1) HIEC $\beta 4$ Actd-HA et (C2) HIECV ont été fixées puis ont été perméabilisées. Ensuite, elles ont été incubées en présence de l'anticorps (C) I86220 ou (D) SC-7392. Les cellules ont finalement été visualisées au microscope à fluorescence.

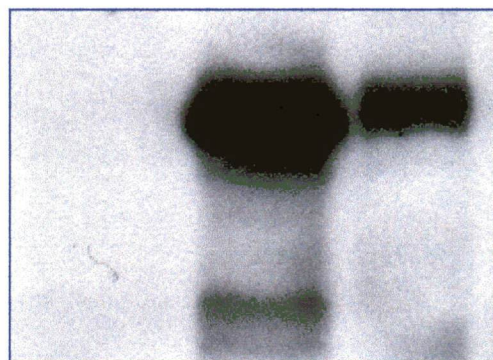
A

Caco-2/15 H β 4Actd-HA H β 4Actd-HA
Transitoires



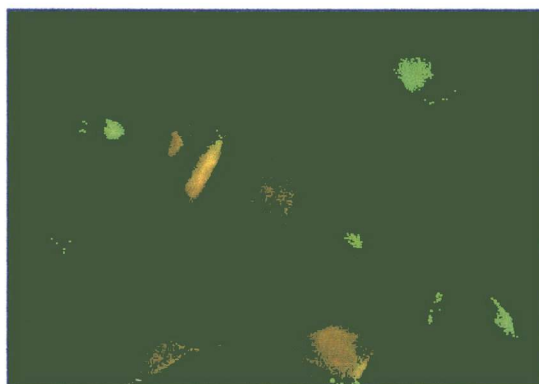
B

HIECV H β 4Actd-HA Caco-2/15



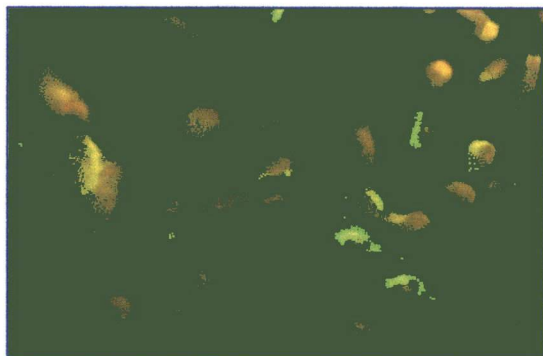
C

HIEC β 4Actd-HA

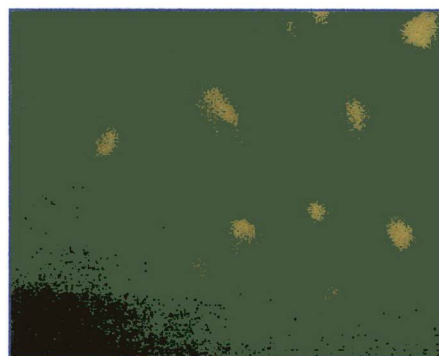


D

1 HIEC β 4Actd-HA



2 HIECV



de la sous-unité $\beta 4$ Actd- endogène des HIECV. Cette expression est également plus élevée que pour les cellules Caco-2/15 confluentes (figure 11B). Cependant, l'expression du $\beta 4$ Actd-HA par les cellules HIEC $\beta 4$ Actd-HA est beaucoup plus faible que l'expression de $\beta 4$ A par les HIEC $\beta 4$ A (figure 10A et 11B). L'analyse d'images en fluorescence de l'anticorps I86220 chez des cellules HIEC $\beta 4$ Actd-HA montre un patron d'expression de la sous-unité $\beta 4$ Actd-HA similaire à celui de la sous-unité $\beta 4$ A par les HIEC $\beta 4$ A; c'est-à-dire que l'expression est forte comparée aux HIECV, mais variable d'une cellule à l'autre (figure 11C et 11D).

2.4 Effets de la surexpression de la sous-unité $\beta 4$ sur la sous-unité $\alpha 6$ chez les cellules HIEC

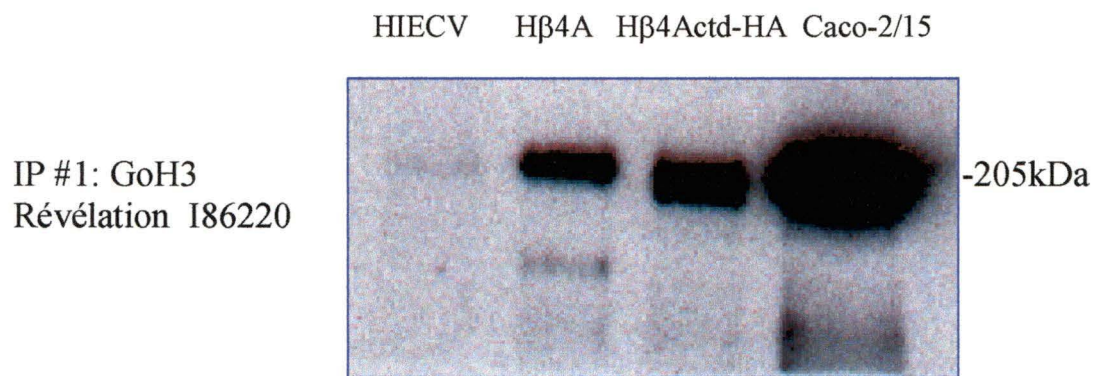
En surexprimant les sous-unités $\beta 4$ A ou $\beta 4$ Actd-HA dans nos cellules HIEC, nous voulions également examiner l'expression de la sous-unité $\alpha 6$ afin de vérifier l'expression de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ A ou $\alpha 6\beta 4$ Actd-HA à la surface de ces dernières. Ces deux sous-unités sont nécessaires pour que l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ soit pleinement fonctionnelle (Dowling et al., 1996; Georges-Labouesse et al., 1996; Pulkinen et al, 1997b). Donc, dans un premier temps, nous avons analysé l'effet de la surexpression de $\beta 4$ A ou de $\beta 4$ Actd-HA sur la formation de l'hétérodimère $\alpha 6\beta 4$. Pour ce, nous avons effectué des immunoprécipitations séquentielles à partir de lysats de cellules HIECV, HIEC $\beta 4$ A, HIEC $\beta 4$ Actd-HA, et Caco-2/15.

Les concentrations des lysats des cellules HIEC β 4A (1x), HIEC β 4Actd-HA (4x) et Caco-2/15 (3x) ont été ajustées pour obtenir environ les mêmes quantités de β 4 dans chacun des échantillons. Le lysat des HIECV (6x) était le plus concentré afin de faciliter la détection de la sous-unité β 4Actd-. Une première immunoprécipitation a été effectuée avec l'anticorps GoH3 qui est dirigé contre la sous-unité α 6 de l'intégrine α 6 β 4. L'analyse par immunobuvardage de ces échantillons avec l'anticorps I86220 montre une nette augmentation de l'expression des complexes α 6 β 4A et α 6 β 4Actd-HA chez les cellules HIEC β 4A et HIEC β 4Actd-HA, respectivement, par rapport aux cellules HIECV (figure 12A). Nous observons donc comme prévu que l'expression basale du complexe α 6 β 4Actd- chez les HIECV est très faible. Les cellules Caco-2/15 possèdent cependant plus de complexes α 6 β 4 que les cellules HIEC infectées (figure 12A). Les intégrines α 6 β 4 encore présentes dans les différents lysats soumis à la première immunoprécipitation ont ensuite été enlevées par une deuxième immunoprécipitation avec l'anticorps GoH3 (données non présentées). Dans le but de vérifier la quantité de sous-unités β 4 non-associées à la sous-unité α 6 dans nos cellules, les mêmes échantillons ont été soumis à une troisième immunoprécipitation effectuée avec l'anticorps 3E1, qui est dirigé contre la partie extracellulaire de β 4, et qui reconnaît donc autant β 4A que β 4Actd-HA et β 4Actd-. L'analyse de l'immunobuvardage avec l'anticorps I86220 montre qu'il y a beaucoup de sous-unités β 4A et β 4Actd-HA non complexées à la sous-unité α 6 chez les cellules HIEC β 4A et HIEC β 4Actd-HA, respectivement (figure 12B). En effet, même si l'expression d' α 6 semble augmenter dans nos cellules HIEC qui

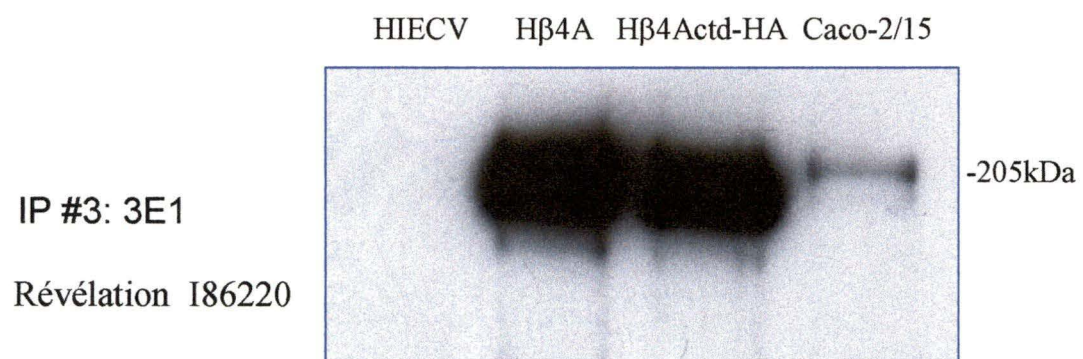
Figure 12. Analyse de l'expression d' $\alpha 6$ par immunoprécipitations séquentielles

Les cellules HIECV, HIEC $\beta 4A$ et HIEC $\beta 4Actd-HA$ ont été cultivées dans du milieu optimem additionné de 10% de sérum. Les cellules Caco-2/15 ont été cultivées dans du milieu DMEM additionné de 10% de sérum. Les cellules HIECV, HIEC $\beta 4A$ et HIEC $\beta 4Actd-HA$ ont été lysées dans du tampon de Laemmli, une journée avant d'atteindre la confluence. Les cellules Caco-2/15 ont été lysées dans du tampon de Laemmli, trois jours avant d'atteindre la confluence. Afin d'équilibrer les quantités de départ de la sous-unité $\beta 4$ dans chaque échantillon, les lysats des cellules HIEC $\beta 4Actd-HA$ et des cellules Caco-2/15 ont été dosés et préparés de façon à ce qu'ils soient respectivement 4x et 3x plus concentrés au départ que le lysat des HIEC $\beta 4A$. Afin de mieux détecter la sous-unité $\beta 4$ présente dans les HIECV, ce lysat a été dosé et préparé de façon à ce que sa concentration soit 6x supérieures à celle du lysat des HIEC $\beta 4A$. Les lysats ont été soumis à trois immunoprécipitations. Les 2 premières immunoprécipitations ont été effectuées avec un anticorps dirigé contre la sous-unité $\alpha 6$ (GoH3) et la troisième avec un anticorps dirigé contre la sous-unité $\beta 4$ (3E1). Les échantillons de la première (A) et de la troisième immunoprécipitation (B) ont été séparés par SDS-PAGE (12%), puis électrotransférés sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont ensuite été mises en contact avec un anticorps dirigé contre la sous-unité $\beta 4$ (I86220). Les bandes ont été révélées à l'aide de la méthode de chemiluminescence. Les sous-unités $\beta 4A$ et $\beta 4Actd-$ et $\beta 4Actd-HA$ migrent à 205 kDa.

A



B



surexpriment $\beta 4A$ ou $\beta 4Actd-HA$, la majeure partie de l'intégrine $\beta 4$ totale présente dans ces cellules demeure libre en raison d'un manque d' $\alpha 6$ (figure 12B). Par contre, chez les cellules Caco-2/15, où l'expression de $\beta 4$ et d' $\alpha 6$ est constitutive, l'expression de $\beta 4$ est environ équivalente à l'expression d' $\alpha 6$, et peu de $\beta 4$ se retrouve non complexés (figure 12B).

2.5 La sous-unité $\alpha 6$ s'associe avec la sous-unité $\beta 4$ et non la sous-unité $\beta 1$ chez les cellules HIEC qui surexpriment $\beta 4A$ ou $\beta 4Actd-HA$

Comme la sous-unité $\beta 1$ des intégrines est constitutivement présente chez les cellules HIEC (Desloges et al., 1998; Basora et al. 1999) et que la sous-unité $\alpha 6$ peut s'associer avec la sous-unité $\beta 1$ pour former l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ (Gaietta et al., 1994; Kumar, 1998; Schaapveld et al., 1998), nous avons voulu vérifier si une partie de l'expression d' $\alpha 6$ induite par la surexpression de $\beta 4$ dans nos cellules HIEC était séquestrée par $\beta 1$. Afin de confirmer la présence de $\beta 1$ dans nos cellules infectées, nous avons effectué une analyse par immunobuvardage des lysats qui avaient été utilisés au départ pour l'immunoprécipitation séquentielle (voir section 2.4). Comme mentionné plus haut, ces lysats étaient de concentrations différentes : HIECV, 6x, HIEC $\beta 4A$, 1X, HIEC $\beta 4Actd-HA$, 4x et Caco-2/15, 3x. Ceci avait pour but de normaliser les quantités de $\beta 4$ présentes chez les cellules HIEC $\beta 4A$, HIEC $\beta 4Actd-HA$ et Caco-2/15, ainsi que de

maximiser la quantité de $\beta 4$ Actd- présente chez les cellules HIECV pour les immunoprécipitations. La détection de la sous-unité $\beta 1$ a été effectuée avec l'anticorps mAB13 (Akiyama et al., 1989). L'analyse de l'immunobuvardage indique que les cellules HIECV, HIEC $\beta 4$ A et HIEC $\beta 4$ Actd-HA expriment la sous-unité $\beta 1$ des intégrines (figure 13A). On observe également par immunobuvardage que les cellules Caco-2/15 expriment moins de $\beta 1$ que les cellules HIECV, HIEC $\beta 4$ A et HIEC $\beta 4$ Actd-HA (figure 13A). Ensuite, nous avons vérifié si une partie de la sous-unité $\alpha 6$ de ces cellules s'associait avec la sous-unité $\beta 1$ présente. Nous avons donc utilisé l'anticorps mAB13 pour détecter $\beta 1$ par un immunobuvardage à partir des immunoprécipités des cellules HIECV, HIEC $\beta 4$ A, HIEC $\beta 4$ Actd-HA et Caco-2/15 obtenus avec l'anticorps GoH3. Aucune protéine ne correspondant à $\beta 1$ n'est détectée, ce qui indique qu' $\alpha 6$ ne se complexe qu'avec $\beta 4$ Actd-, $\beta 4$ A et $\beta 4$ Actd-HA et non $\beta 1$ dans nos cellules HIEC infectées (figure 13B).

2.6 Localisation à la membrane cytoplasmique d' $\alpha 6\beta 4$ A chez les cellules HIEC $\beta 4$ A, et d' $\alpha 6\beta 4$ Actd-HA chez les cellules HIEC $\beta 4$ Actd-HA

Tel que mentionné lors de l'introduction, l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est un récepteur des laminines et elle doit être intégrée dans la membrane cytoplasmique pour être fonctionnelle (Niessen et al, 1994; Rouselle et Aumailley, 1994; Nievers et al., 1998). Nous avons donc évalué les quantités de sous-unités $\beta 4$ Actd-, $\beta 4$ A et

Figure 13. Analyse de l'association entre $\alpha 6$ et $\beta 1$

Les cellules HIECV, HIEC $\beta 4A$ et HIEC $\beta 4Actd-HA$ ont été cultivées dans du milieu optimem additionné de 10% de sérum. Les Caco-2/15 ont été cultivées dans du milieu DMEM additionné de 10% de sérum. Les cellules HIECV, HIEC $\beta 4A$ et HIEC $\beta 4Actd-HA$ ont été lysées dans du tampon de Laemmli une journée avant d'atteindre la confluence. Les cellules Caco2/15 ont été lysées dans du tampon de Laemmli trois jours avant d'atteindre la confluence. Afin d'équilibrer les quantités de départ de la sous-unité $\beta 4$ dans chaque échantillon, les lysats des cellules HIEC $\beta 4Actd-HA$ et des cellules Caco-2/15 ont été dosés et préparés de façon à ce qu'ils soient respectivement 4x et 3x plus concentrés au départ que le lysat des HIEC $\beta 4A$. Afin de mieux détecter la sous-unité $\beta 4$ présente dans les HIECV, ce lysat a été dosé et préparé de façon à ce que sa concentration soit 6x supérieure à celle du lysat des HIEC $\beta 4A$. Les lysats ont été soumis à une immunoprécipitation effectuée avec un anticorps dirigé contre la sous-unité $\alpha 6$ (GoH3). (A) Les lysats et l'immunoprécipitation avec (B) GoH3 ont été séparés par SDS-PAGE (12%), puis, électrotransférés sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont ensuite été mises en contact avec un anticorps reconnaissant la sous-unité $\beta 1$ (mAB13). Les bandes ont été révélées à l'aide de la méthode de chemiluminescence. La sous-unité $\beta 1$ migre à 105 kDa

A

Lysat
Révélation: mAB13

B

IP#1: GoH3
Révélation : mAB13

HIECV HIEC β 4A H β 4ctd-HA Caco-2/15

HIECV HIEC β 4A H β 4ctd-HA Caco-2/15

105kDa-



-105kDa

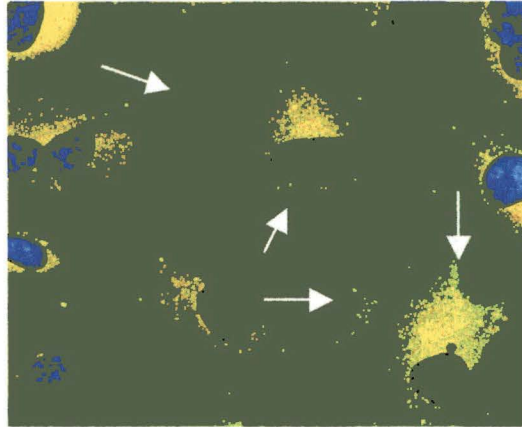
$\beta 4$ Actd-HA localisées dans cette membrane chez nos cellules HIECV, HIEC $\beta 4$ A et HIEC $\beta 4$ Actd-HA respectivement. Du même coup, nous avons évalué les quantités d' $\alpha 6\beta 4$ sauvage ou mutée présente à la membrane cytoplasmique, et donc fonctionnelle dans chacun de nos modèles cellulaires. Pour ce, nous avons effectué des immunofluorescences chez des cellules non-perméabilisées avec l'anticorps 3E1 qui est dirigé contre la partie extracellulaire de $\beta 4$. L'anticorps demeurant à l'extérieur des cellules, il ne peut alors se lier qu'à la partie extracellulaire des sous-unités $\beta 4$ présentes dans la membrane cytoplasmique. Les résultats indiquent que les cellules HIEC $\beta 4$ A expriment fortement $\beta 4$ A à la membrane, en comparaison avec l'expression de $\beta 4$ Actd- par les cellules HIECV (figure 14A et 14B). Ces dernières semblent d'ailleurs quasi-négatives vu la très faible quantité de $\beta 4$ Actd- présente dans leurs membranes cytoplasmiques (figure 14B). Le marquage irrégulier des cellules HIEC $\beta 4$ A non perméabilisées est caractéristique d'un marquage extracellulaire (figure 14A) si on le compare au marquage des cellules perméabilisées qui lui est beaucoup plus constant et moins étalé (figure 14C). Le marquage de la sous-unité $\beta 4$ A à la surface des cellules HIEC $\beta 4$ A est hétérogène de cellule en cellule et semble suivre le même patron d'expression que le marquage de la sous-unité $\beta 4$ A totale présente dans ces cellules (figure 14A et 14C). Cependant, l'expression de la sous-unité $\beta 4$ A présente à la surface des cellules HIEC $\beta 4$ A est beaucoup plus faible que l'expression totale de la sous-unité $\beta 4$ A chez ces cellules (figure 14A et 14C). Comme l'anticorps 3E1 est très bon en immunofluorescence

Figure 14. Analyse de la surexpression de la sous-unité $\beta 4A$ à la membrane cytoplasmique des cellules HIEC $\beta 4A$

Les cellules HIECV et HIEC $\beta 4A$ ont été cultivées dans du milieu optimem additionné de 10% de sérum. Les cellules HIEC $\beta 4A$ (A) et HIECV (B) ont été fixées et n'ont pas été perméabilisées. Les cellules HIEC $\beta 4A$ (C) ont été fixées et perméabilisées. Ensuite, elles ont été incubées en compagnies d'un anticorps dirigé contre la partie extracellulaire de $\beta 4$ (3E1) (A et B) ou contre la partie cytoplasmique de $\beta 4$ (I86220) (C). Leurs noyaux ont été marqués aux DAPI (points bleus). Pour finir, elles ont été visualisées au microscope à fluorescence. Il est à noter que le marquage observé à la surface des cellules HIEC $\beta 4A$ (A) correspond à la sous-unité $\beta 4A$ extracellulaire surexprimée. Ce marquage est très faible chez les cellules HIECV (B). Les flèches délimitent la marge latérale des cellules (A et B). La couleur orangé observée en A et en B est attribuable à de l'auto-fluorescence des cellules.

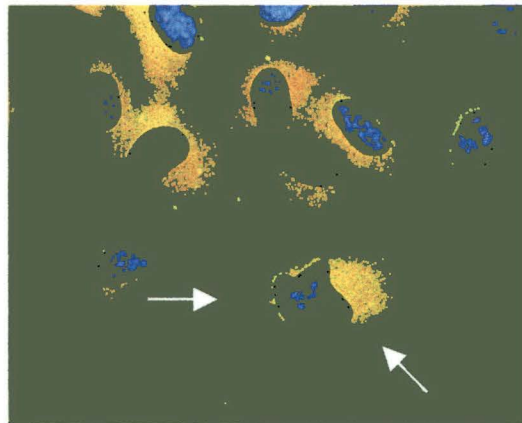
A

HIEC β 4A non perméabilisées 3E1



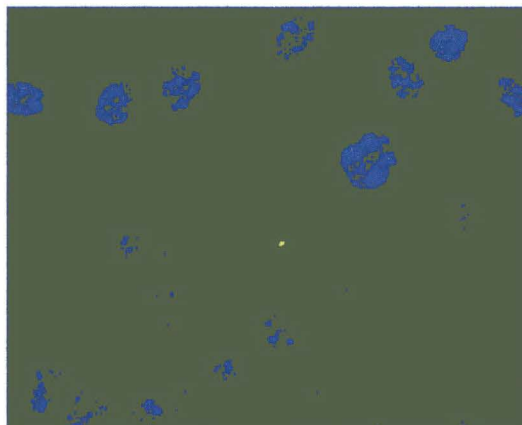
B

HIECV non perméabilisées 3E1



C

HIEC β 4A perméabilisées I86220



(Hessle et al., 1984; Hauptmann et al., 1995), ceci exclue la possibilité que le marquage plus faible soit dû à l'anticorps. Cela indique donc qu'une partie seulement de la sous-unité $\beta 4A$ surexprimée par les cellules se retrouve dans la membrane cytoplasmique, et que l'autre partie demeure dans le cytoplasme. Enfin, les HIEC $\beta 4Actd$ -HA ont un patron d'expression de la sous-unité $\beta 4Actd$ -HA à la membrane cytoplasmique similaire au patron d'expression des HIEC $\beta 4A$ pour la sous-unité $\beta 4A$ (données non présentées).

3. Propriétés d'adhésion aux laminines des cellules HIECV, HIEC $\beta 4A$ et HIEC $\beta 4Actd$ -HA

3.1 Adhésion aux laminines

L'augmentation des intégrines $\alpha 6\beta 4A$ ou $\alpha 6\beta 4Actd$ -HA dans la membrane cytoplasmique de nos cellules étant confirmée, nous voulions ensuite tester la fonctionnalité des cellules HIECV, HIEC $\beta 4A$ et HIEC $\beta 4Actd$ -HA envers l'adhésion aux laminines. Notre hypothèse était que les cellules HIEC $\beta 4A$, qui expriment $\beta 4A$, une sous-unité fonctionnelle pour l'adhésion aux laminines (Niessen et al., 1994; Rouselle et Aumailey, 1994), auraient une meilleure capacité d'adhésion que les cellules HIECV, et HIEC $\beta 4Actd$ -HA qui expriment une sous-unité $\beta 4$ tronquée et non-fonctionnelle pour l'adhésion aux laminines (Basora et al., 1999). Nous avons donc soumis les trois différentes lignées d'HIEC à des tests d'adhésion sur trois différentes laminines. Suite à des tests

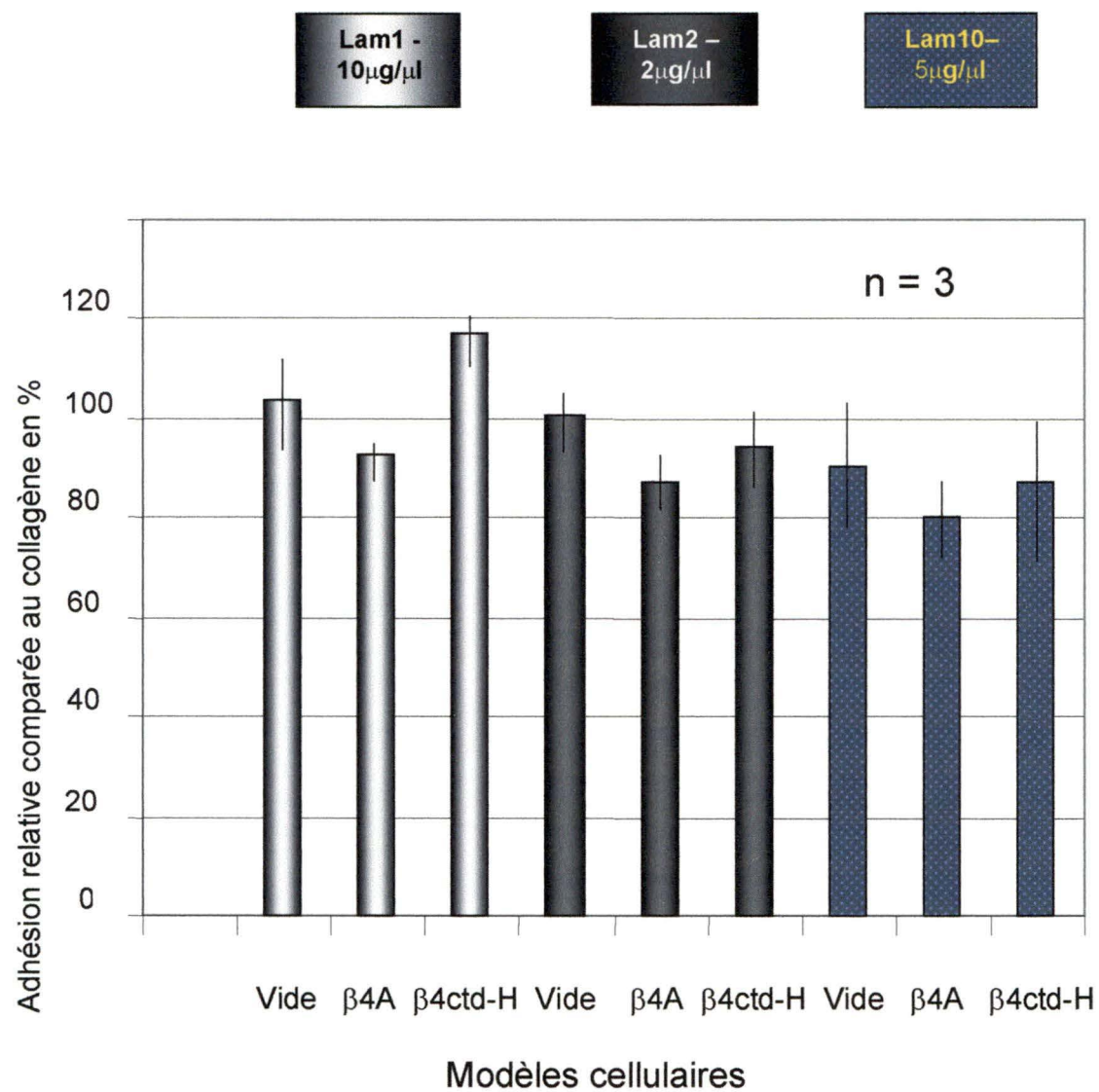
préliminaires avec des cellules HIEC non-infectées (données non présentées), les concentrations des différentes laminines ont été choisies pour obtenir un maximum d'adhésion : la laminine-1 à 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, la laminine-2 à 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ et la laminine-10 à 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Trois tests d'adhésion différents ont ensuite été effectués pendant 30 minutes sans anticorps bloquant l'adhésion médiée par les intégrines. Les niveaux relatifs d'adhésion, en pourcentage, ont été évalués en comparant l'adhésion de chaque lignée cellulaire avec leur adhésion non-spécifique respective obtenue sur collagène (100%). L'analyse des données montre qu'il n'y a pas de différence significative dans ces conditions entre l'adhésion des cellules HIECV, HIEC β 4A et HIEC β 4Actd-HA, tant sur la laminine-1 que sur la laminine-2 ou la laminine-10 (figure 15).

3.2 Adhésion à la laminine-1 en bloquant la sous-unité β 1 des intégrines

Suite aux résultats obtenus grâce aux tests d'adhésion sans anticorps (section 3.1), nous voulions vérifier si l'adhésion médiée par les intégrines formées de la sous-unité β 1 n'était pas trop forte pour nous permettre de détecter l'adhésion potentiellement médiée par les différentes formes d' α 6 β 4. Nous avons donc effectué des tests d'adhésion avec un anticorps monoclonal bloquant la sous-unité β 1, l'anticorps mAB13 (Akiyama et al., 1989). Nous avons réalisé ces tests sur les laminine-1,2 et 10. Les premiers tests consistaient à incuber préalablement les cellules pendant 30 minutes avec l'anticorps mAB13

Figure 15. Tests d'adhésion de 30 minutes sur la laminine-1, la laminine-2 et la laminine-10, sans anticorps bloquant l'adhésion médiée par les intégrines

Les cellules HIECV (vide), HIEC β 4A (β 4A) et HIEC β 4Actd-HA (β 4ctd-H) ont été cultivées dans du milieu optimem additionné de 10% de sérum. Les cellules HIEC étaient sevrées dans du milieu OptiMEM 0.5% BSA, de 5 à 6 heures avant d'être passées un dans un. Ces cellules étaient récupérées 16 à 18 heures plus tard puis resuspendues et laissées en attente une heure. Subséquemment, 50 000 cellules par puits étaientensemencées et les plaques étaient placées dans un incubateur à 37°C, pendant 30 minutes. Après, les cellules étaient sorties de l'incubateur et une méthode de lecture par colorimétrie était utilisée pour estimer le nombre d'entre elles ayant adhérees dans chaque puits. Les niveaux relatifs d'adhésion, en pourcentage, ont été évalués en comparant l'adhésion de chaque lignée cellulaire avec leur adhésion non-spécifique respective obtenue sur collagène (100%). Les colonnes représentent la moyenne, \pm l'erreur standard sur la moyenne (SEM c'est-à-dire " standard error on mean") pour chaque lignée cellulaire pour 3 expériences séparées (n=3).



avant de les ensemer dans les puits. Ce protocole ne nous a cependant pas permis de démontrer de différences entre l'adhésion des HIECV, des HIEC β 4A et des HIEC β 4Actd-HA (donnés non présentées). Nous avons ensuite vérifié si nos cellules requièrent une adhésion préliminaire sur la laminine pour activer l'adhésion médiée par α 6 β 4A, α 6 β 4Actd-HA ou α 6 β 4Actd-. Nous avons donc utilisé un autre protocole qui consistait à ajouter l'anticorps bloquant β 1 dans les puits après 30 minutes d'adhésion préliminaire sur les laminines-1,2 ou 10. C'est la laminine-1 qui nous a permis d'obtenir les meilleurs résultats préliminaires pour l'effet bloquant du mAB13. Nous avons par la suite travaillé uniquement avec cette laminine qui est reconnue pour être un excellent ligand pour α 6 β 4 (Rabinovitz et Mercurio, 1997). Nous voulions ensuite trouver quel temps d'incubation, dans ces conditions, nous permettrait d'observer le meilleur effet bloquant de la part de l'anticorps mAB13. Ainsi, à ce temps nous devrions observer les différences d'adhésion les plus significatives entre nos trois lignées cellulaires. Les cellules adhérentes ont donc été fixées à différents temps, c'est-à-dire 30, 60, 120 ou 180 minutes après l'ajout de l'anticorps bloquant β 1. L'adhésion des trois lignées cellulaires a ensuite été comparée à leur adhésion respective après 30 minutes sans anticorps bloquant. Les résultats de cette expérience montrent que, seulement 30 minutes après l'ajout de l'anticorps, l'adhésion des cellules HIECV et HIEC β 4A chute sous les 75% de l'adhésion initiale. L'adhésion des cellules HIEC β 4Actd-HA, diminue plus fortement et atteint 58% (figure 16). Après 60 minutes avec l'anticorps, l'adhésion des cellules HIEC β 4A est de 78% et celle des cellules HIEC β 4Actd-HA demeure

stable à 57%, mais l'adhésion des cellules HIECV baisse cependant à 35% (figure 16). À 60 minutes, nous observons que l'adhésion des cellules HIEC β 4A est supérieure à celle des deux autres lignées cellulaires (figure 16). C'est à 120 minutes que l'on obtient les valeurs les plus faibles : l'adhésion des cellules HIEC β 4A diminue à 39% de l'adhésion initiale, mais demeure supérieure à l'adhésion des cellules HIECV et HIEC β 4Actd-HA qui baisse respectivement jusqu'à 23% et 12% (figure 16). 180 minutes après l'ajout de l'anticorps, les valeurs reviennent à des niveaux plus élevés : les cellules HIEC β 4A obtiennent alors 72% de l'adhésion initiale alors que les cellules HIEC β 4Actd-HA en exhibent 52% et les cellules HIECV 46% (figure 16). C'est donc à 120 minutes que l'on obtient l'effet bloquant maximal sur la sous-unité β 1 par l'anticorps mAB13. De plus, ces résultats laissent entrevoir que les cellules HIEC β 4A démontrent une meilleure adhésion sur la laminine-1 que les cellules HIECV et HIEC β 4Actd-HA.

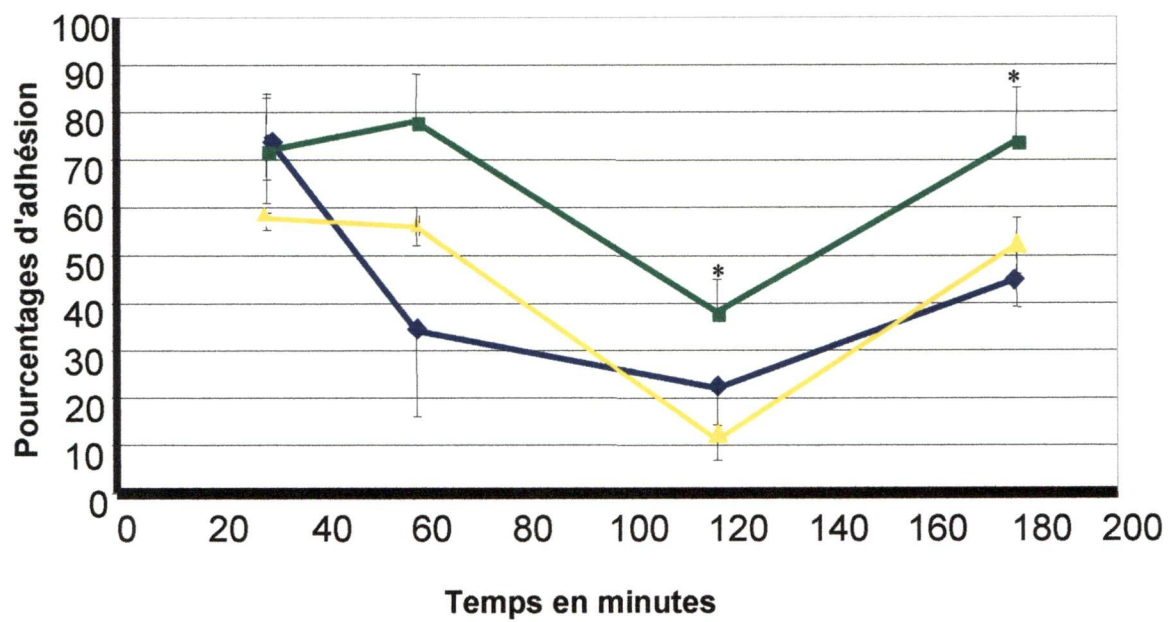
Afin de vérifier si les résultats obtenus dans les tests préliminaires étaient reproductibles, nous avons donc soumis les cellules HIECV, HIEC β 4A et HIEC β 4Actd-HA à une adhésion initiale de 30 minutes à la laminine-1, puis ajouté l'anticorps mAB13 pendant 120 minutes avant de fixer les cellules adhérentes. Les résultats compilés indiquent que les cellules HIEC β 4A conservent en moyenne 36% de l'adhésion initiale, tandis que l'adhésion des cellules HIECV et HIEC β 4Actd-HA a diminué jusqu'à 25% et 16% respectivement (figure 17).

Figure 16. Cinétiques de désadhésion des cellules HIECV, HIEC β 4A et HIEC β 4Actd-HA suite à l'ajout de l'anticorps bloquant β 1, chez des cellules déjà adhérentes

Les cellules HIECV (vide), HIEC β 4A (β 4A) et HIEC β 4Actd-HA (β 4Actd-HA) ont été cultivées dans du milieu Optimem additionné de 10% de sérum. Les cellules HIEC étaient sevrées dans du milieu OptiMEM 0.5% BSA, de 5 à 6 heures avant d'être passées un dans un. Elles étaient ensuite récupérées 16 à 18 heures plus tard puis resuspendues et laissées en attente une heure. Subséquentement, 50 000 cellules par puits étaient ensemencées sur de la laminine-1 et les plaques étaient placées dans un incubateur à 37°C, pendant 30 minutes. Après, l'anticorps mAB13 (10 μ g/ μ l) bloquant la sous-unité β 1 était ajouté dans chaque puits. Les cellules étaient ensuite fixées à différents temps (30, 60, 120 et 180 minutes) et une méthode de lecture par colorimétrie était utilisée pour estimer le nombre d'entre elles ayant adhérentes dans chaque puits. Les niveaux relatifs d'adhésion, en pourcentage, ont été évalués en comparant l'adhésion de chaque lignée cellulaire avec leur adhésion respective obtenue après 30 minutes d'adhésion à la laminine-1 sans anticorps (100%). Les points reliés par la courbe représentent la moyenne, \pm SEM (l'erreur standard sur la moyenne) pour chaque temps pour 1 expérience avec un minimum de 3 essais séparés ($n \leq 3$). Les différences statistiquement significatives entre les différentes lignées cellulaires, sont représentées par un astérisque ($0.001 \leq p \leq 0.05$).

Vide
 β 4A
 β 4Actd-HA

* = $0.001 \leq p \leq 0.05$



les cellules HIEC β 4A et HIEC β 4Actd-HA, sont statistiquement significatives. Ceci indique que les cellules HIEC β 4A ont de meilleures propriétés d'adhésion à la laminine-1 que les cellules HIECV et HIEC β 4Actd-HA dans ces conditions.

3.3 Adhésion à la laminine-1 en bloquant les sous-unités α 6 et β 1 des intégrines

Ensuite nous voulions vérifier si l'adhésion supérieure observée chez les cellules HIEC β 4A et non chez les cellules HIEC β 4Actd-HA était bel et bien due à l'intégrine α 6 β 4A. Nous avons donc ajouté l'anticorps mAB13 et l'anticorps GoH3 qui bloque l'adhésion médiée par la sous-unité α 6 des intégrines (et donc les capacités adhésives de l'intégrine α 6 β 4) (Van Waes et al., 1991; Kikkawa Y. et al., 2000), à des cellules déjà adhérentes sur la laminine-1 depuis 30 minutes. Après 120 minutes d'incubation avec les anticorps, les cellules adhérentes étaient fixées. Si l'adhésion à la laminine-1 des cellules HIEC β 4A est médiée par α 6 β 4A, les cellules HIECV, HIEC β 4A et HIEC β 4Actd-HA exhiberont des niveaux d'adhésion similaires. Nos résultats indiquent que les trois lignées cellulaires exhibent des propriétés d'adhésion à la laminine-1 non-statistiquement différentes d'une lignée à l'autre dans ces conditions (figure 18) (cependant il serait préférable d'augmenter le nombre d'expériences séparées de quatre à huit tout comme à la figure 17, afin de confirmer pleinement la valeur statistique de ces résultats). Ceci indique donc que l'adhésion supérieure observée préalablement chez les cellules HIEC β 4A (figure 17) est bel et bien due à l'intégrine α 6 β 4A.

Figure 17. Tests d'adhésion de 120 minutes avec un anticorps bloquant $\beta 1$, chez des cellules déjà adhérentes depuis 30 minutes

Les cellules HIECV (vide), HIEC $\beta 4A$ ($\beta 4A$) et HIEC $\beta 4Actd-HA$ ($\beta 4Actd-HA$) ont été cultivées dans du milieu Optimem additionné de 10% de sérum. Les HIEC étaient sevrées dans du milieu OptiMEM 0.5% BSA, de 5 à 6 heures avant d'être passées un dans un. Elles étaient ensuite récupérées 16 à 18 heures plus tard puis resuspendues et laissées en attente une heure. Subséquemment, 50 000 cellules par puits étaient ensemencées sur de la laminine-1 et les plaques étaient placées dans un incubateur à 37°C, pendant 30 minutes. Après, l'anticorps mAB13(10 μ g/ μ l) bloquant la sous-unité $\beta 1$ était ajouté dans chaque puits. Les cellules étaient fixées après 120 minutes et une méthode de lecture par colorimétrie était utilisée pour estimer le nombre d'entre elles ayant adhéré dans chaque puits. Les niveaux relatifs d'adhésion, en pourcentage, ont été évalués en comparant l'adhésion de chaque lignée cellulaire avec leur adhésion respective obtenue après 30 minutes d'adhésion à la laminine-1 sans anticorps (100%). Les colonnes représentent la moyenne, \pm SEM (l'erreur standard sur la moyenne) pour chaque lignée cellulaire pour 8 expériences séparées ($n=8$). Les différences statistiquement significatives entre les différentes lignées cellulaires, sont représentées par un astérisque ($0.001 \leq p \leq 0.05$).

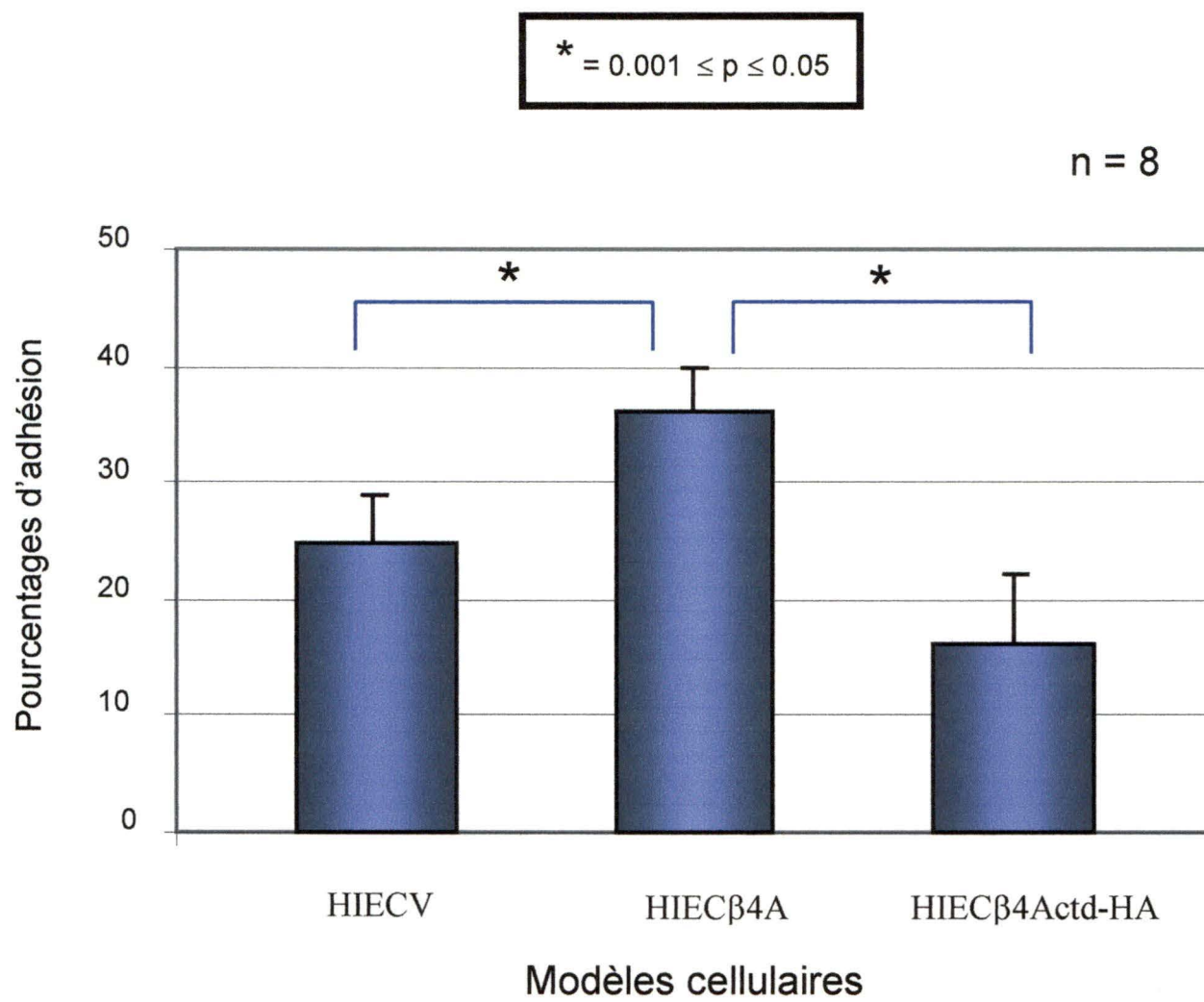
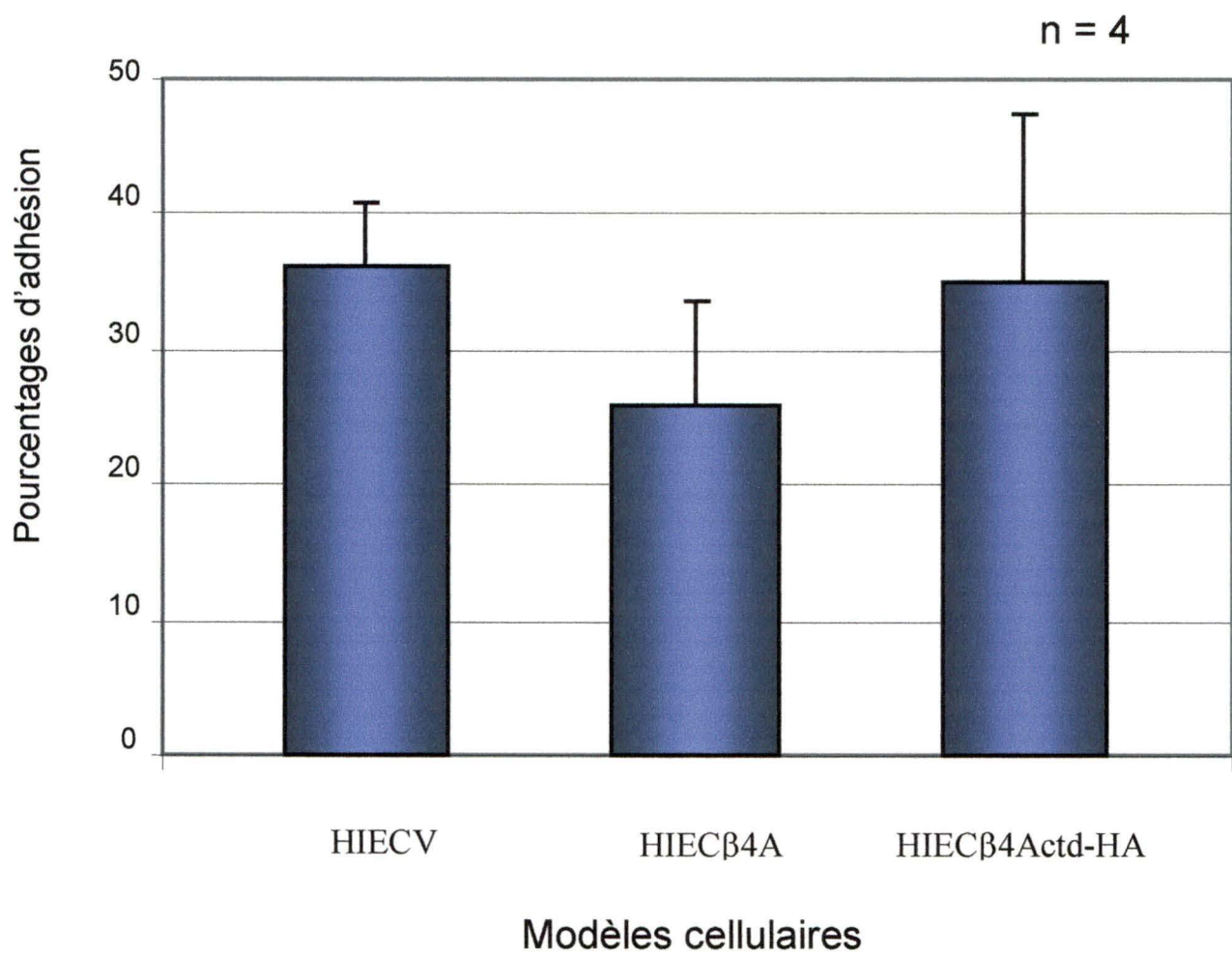


Figure 18. Tests d'adhésion de 120 minutes avec les anticorps bloquant $\beta 1$ et $\alpha 6$, chez des cellules déjà adhérentes depuis 30 minutes

Les cellules HIECV (vide), HIEC $\beta 4A$ ($\beta 4A$) et HIEC $\beta 4Actd-HA$ ($\beta 4Actd-HA$) ont été cultivées dans du milieu Optimem additionné de 10% de sérum. Les HIEC étaient sevrées dans du milieu OptiMEM 0.5% BSA, de 5 à 6 heures avant d'être passées un dans un. Elles étaient ensuite récupérées 16 à 18 heures plus tard puis resuspendues et laissées en attente une heure. Subséquentement, 50 000 cellules par puits étaient ensemencées sur de la laminine-1 et les plaques étaient placées dans un incubateur à 37°C, pendant 30 minutes. Après, les anticorps mAB13 (10 μ g/ μ l) bloquant la sous-unité $\beta 1$, et GoH3 (10 μ g/ μ l) bloquant la sous-unité $\alpha 6$ étaient ajoutés dans chaque puits. Les cellules étaient fixées après 120 minutes et une méthode de lecture par colorimétrie était utilisée pour estimer le nombre d'entre elles ayant adhéré dans chaque puits. Les niveaux relatifs d'adhésion, en pourcentage, ont été évalués en comparant l'adhésion de chaque lignée cellulaire avec leur adhésion respective obtenue après 30 minutes d'adhésion à la laminine-1 sans anticorps (100%). Les colonnes représentent la moyenne, \pm SEM (l'erreur standard sur la moyenne) pour chaque lignée cellulaire pour 4 expériences séparées (n=4). Les différences d'adhésion entre les différentes lignées cellulaires ne sont pas statistiquement significatives.



IV-Discussion

Des études récentes dans notre laboratoire ont démontré la présence d'un variant de la sous-unité β de l'intégrine $\alpha 6\beta 4A$ au niveau des cryptes intestinales humaines et de leur modèle cellulaire équivalent, les cellules HIEC (Basora et al., 1999). Ce variant, appelé $\beta 4Actd-$, ne possède pas les derniers 20-30 acides aminés du domaine cytoplasmique de la sous-unité $\beta 4A$ et ne semble pas fonctionnel envers l'adhésion aux laminines (Basora et al., 1999). Pour la présente étude, nous voulions développer des outils afin de mieux comprendre l'implication et les rôles des intégrines $\alpha 6\beta 4A$ et $\alpha 6\beta 4Actd-$ dans les cellules intestinales. Pour ce faire, nous avons d'abord produit, par mutagenèse dirigée à partir de l'ADNc de la sous-unité $\beta 4A$ complète, un ADNc codant pour l'équivalent de la sous-unité $\beta 4Actd-$ de l'intégrine, l'ADNc $\beta 4Actd-HA$. Ces deux ADNc ont ensuite été clonés dans le vecteur d'expression pLNCX2 et subséquemment introduits par infection rétrovirale dans des cellules HIEC. Les analyses des immunobuvardages ainsi que des immunofluorescences indirectes indiquent bien une surexpression des protéines $\beta 4A$ et $\beta 4Actd-HA$ dans les cellules HIEC $\beta 4A$ et HIEC $\beta 4Actd-HA$ respectivement. De plus, nous constatons, à l'aide d'immunoprécipitations séquentielles, que la surexpression de la sous-unité $\beta 4$ dans nos cellules provoque une augmentation significative de l'expression de la sous-unité $\alpha 6$. Nous observons également une augmentation

des intégrines $\alpha 6\beta 4A$ et $\alpha 6\beta 4Actd-HA$ à la membrane cytoplasmique de nos cellules. D'autre part, des tests d'adhésion sur différentes laminines, effectués sans anticorps bloquant, ne permettent pas d'observer de différences d'adhésion entre les cellules HIECV, HIEC $\beta 4A$ et HIEC $\beta 4Actd-HA$. Cependant, des tests sur laminine-1 effectués en bloquant la sous-unités $\beta 1$ des intégrines de cellules déjà adhérees depuis 30 minutes, permettent d'observer une plus grande capacité d'adhésion des cellules HIEC $\beta 4A$ à la laminine-1 comparé aux cellules HIECV et HIEC $\beta 4Actd-HA$. Cette adhésion supérieure est, de plus, inhibée en bloquant la sous-unité $\alpha 6$ des intégrines. Ces résultats indiquent que l'augmentation de capacité d'adhésion exhibée par les cellules HIEC $\beta 4A$ serait médiée par l'intégrine $\alpha 6\beta 4A$. De plus, nos résultats confirment fonctionnellement les résultats obtenus par Basora et al. en 1999, c'est-à-dire que l'intégrine $\alpha 6\beta 4Actd-$ est non-fonctionnelle envers l'adhésion aux laminines. Finalement, nos travaux complètent les travaux de Basora et al., en identifiant formellement le bout ctd manquant de la sous-unité $\beta 4Actd-$ comme responsable de la perte des capacités adhésives de l'intégrine $\alpha 6\beta 4Actd-$.

1. Surexpression de la sous-unité $\beta 4A$ ou $\beta 4Actd-HA$ dans les cellules HIEC

Un des objectifs du projet était de développer des outils afin de mieux comprendre l'implication fonctionnelle des 20 à 30 derniers acides aminés du

domaine cytoplasmique de $\beta 4$ (extrémité ctd) dans les cellules cryptales intestinales. Les cellules HIEC n'expriment normalement qu'une faible quantité de la sous-unité $\beta 4$ et exclusivement sous la forme $\beta 4\text{Actd-}$. À partir de l'ADNc codant pour la sous-unité $\beta 4A$, nous avons généré des cellules HIEC surexprimant la forme sauvage de cette sous-unité. Pour permettre une analyse comparative des propriétés de ces intégrines, nous avons également généré des cellules surexprimant la sous-unité $\beta 4\text{Actd-}$. Pour ce faire, nous avons créé par mutagenèse dirigée un ADNc codant pour la sous-unité $\beta 4\text{Actd-}$ auquel un marqueur HA a été ajouté en C-terminal ($\beta 4\text{Actd-HA}$) afin de faciliter la détection de notre protéine et la différencier de la sous-unité $\beta 4\text{Actd-}$ endogène.

L'utilisation du vecteur d'expression pLNCX2, introduit dans les cellules par infection rétrovirale, nous a permis de surexprimer $\beta 4A$ et $\beta 4\text{Actd-HA}$ chez les cellules HIEC : Les rétrovirus intègrent les gènes dans le génome des cellules par les promoteurs LTR du vecteur, ce qui augmente beaucoup les capacités d'expression de la protéine par les cellules (Colosimo et al., 2000). Cette technique nous a permis d'obtenir des populations de cellules HIEC résistantes aux antibiotiques, exprimant $\beta 4A$ ou $\beta 4\text{Actd-HA}$, dans une proportion d'environ 90%. De plus, le fait que plusieurs cellules sont infectées lors de la même infection nous permet d'obtenir des populations de cellules beaucoup plus représentatives des cellules HIEC normales que si nous aurions procédé par clonage cellulaire. À cet effet, nos résultats indiquent une surexpression hétérogène de $\beta 4A$ et de $\beta 4\text{Actd-HA}$ de cellule en cellule qui est probablement

une conséquence du fait que nous n'avons pas cloné nos lignées cellulaires HIEC β 4A et HIEC β 4Actd-HA. Bien qu'il soit possible que le nombre de copies d'ADNc de β 4A ou de β 4Actd-HA intégrées lors des infections rétrovirales par les cellules HIEC en soit partiellement responsable, la principale cause de ce phénomène semble être le site d'intégration de l'insert dans le génome (Yee et al., 1994).

Les cellules HIEC normales expriment une sous-unité β 4A tronquée (Basora et al., 1999). La sous-unité β 4A serait clivée de façon co-translationnelle pour former la sous-unité β 4Actd-. L'analyse de nos résultats indique que la sous-unité β 4A exprimée chez les HIEC β 4A est entière et qu'elle possède donc la terminaison ctd de son domaine cytoplasmique. Ceci suggère que la machinerie de la cellule, probablement en raison de la trop grande quantité de β 4 surexprimée, ne parvient pas à cliver cette sous-unité significativement. Nous avons ensuite analysé le patron d'expression des sous-unités β 4A et β 4Actd-HA dans nos cellules. Nos résultats indiquent également que les HIEC β 4A et HIEC β 4Actd-HA exhibent de forts niveaux d'expression de β 4A et de β 4Actd-HA respectivement. Cependant, nous avons constaté, lors de deux séries d'infections différentes, que les cellules HIEC β 4A semblent exprimer en moyenne plus de β 4A que les HIEC β 4Actd-HA n'expriment de β 4Actd-HA. Nous ne savons cependant pas quelles sont les raisons de cet écart de capacité d'expression entre ces deux lignées cellulaires. Il serait possible que la forme sauvage soit mieux tolérée à haut niveau par les cellules HIEC.

Nous savons déjà, grâce à des travaux effectués dans notre laboratoire, que les deux variantes de la sous-unité $\beta 4$, $\beta 4A$ et $\beta 4Actd$ - ($\beta 4Actd$ -HA), peuvent s'associer à la sous-unité $\alpha 6$ pour l'hétérodimérisation (Basora et al., 1999). Nous savons également que dans la plupart des conditions, les deux sous-unités $\alpha 6$ et $\beta 4$ sont nécessaires pour que l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ soit pleinement fonctionnelle (Dowling et al., 1996; Georges-Labouesse et al., 1996; Pulkkinen et al, 1997b). Il était donc nécessaire, afin que nos cellules HIEC $\beta 4A$ et HIEC $\beta 4Actd$ -HA forment un plus grand nombre de complexes $\alpha 6\beta 4A$ et $\alpha 6\beta 4Actd$ -HA, qu'elles expriment une plus grande quantité de sous-unités $\alpha 6$ que les cellules HIECV. Cependant, nous ne possédions pas l'ADNc codant pour la sous-unité $\alpha 6$ qui nous aurait permis de surexprimer cette protéine dans nos cellules. Ainsi, en prenant compte des travaux qui démontrent que des souris KNOCK-OUT pour $\beta 4$ exhibent une baisse marquée de l'expression de la sous-unité $\alpha 6$ (Dowling et al., 1996), nous avons émis l'hypothèse que la surexpression des sous-unités $\beta 4A$ ou $\beta 4Actd$ -HA dans nos cellules provoquerait une hausse de l'expression d' $\alpha 6$. Nos résultats indiquent que c'est bel et bien le cas et que les quantités d' $\alpha 6$ complexées à $\beta 4A$ ou $\beta 4Actd$ -HA dans nos cellules sont beaucoup supérieures à celles observées chez les HIECV. Nous observons également que les quantités de complexe pour les deux lignées cellulaires sont comparables. La surexpression dans nos cellules de $\beta 4A$ ou $\beta 4Actd$ -HA a donc provoqué, comme prévu, une augmentation marquée de l'expression d' $\alpha 6$. Puisque les cellules HIEC $\beta 4A$ expriment plus de $\beta 4A$ que les cellules

HIEC β 4Actd-HA expriment de β 4Actd-HA, et que les deux lignées cellulaires expriment environ les mêmes quantités d' α 6, nous présumons que la corrélation entre la surexpression de β 4 et l'augmentation d'expression d' α 6 n'est pas directement proportionnelle. Il est en effet possible que l'augmentation de l'expression d' α 6 par la surexpression de β 4 ne puisse dépasser un certain niveau, ce qui signifierait que les HIEC β 4A et les HIEC β 4Actd-HA auraient atteint cette limite car les deux lignées cellulaires expriment environ les mêmes quantités d' α 6. Jusqu'à maintenant, aucune recherche pouvant expliquer la nature d'une telle augmentation de la sous-unité α 6 par la surexpression de la sous-unité β 4 n'a été rapportée dans la littérature. D'autre part, nos résultats confirment que les cellules HIEC β 4A et HIEC β 4Actd-HA expriment beaucoup plus de β 4 que d' α 6 malgré l'augmentation d'expression d' α 6 en réponse à la surexpression de β 4. Une part importante de la sous-unité β 4 exprimée par nos deux lignées cellulaires se retrouve donc non-associée à α 6. Ceci implique que la sous-unité β 4 demeure libre dans le cytoplasme plutôt que de se retrouver à la membrane, la sous-unité α 6 étant nécessaire pour l'emplacement correcte de l'intégrine α 6 β 4 dans la cellule (Poumay et al., 1993; Gaietta et al, 1994). À cet effet, nos analyses par immunofluorescence suggèrent que la quantité de β 4 exprimée à la membrane cytoplasmique chez nos deux lignées cellulaires correspond beaucoup plus à la quantité d' α 6 (α 6 β 4) qu'à la quantité de β 4 totale dans les cellules. Toutefois, il faut également considérer que la totalité de l'intégrine α 6 β 4 de nos cellules ne se retrouve pas exprimée à la membrane de

celles-ci, une certaine partie pouvant être localisée dans des vésicules intracytoplasmiques après endocytose (Bretscher, 1992). La proportion de cette intégrine se retrouvant dans le cytoplasme de nos cellules est cependant difficile à évaluer, mais à titre d'exemple, elle est de 20% chez les cellules A431 (Bretscher, 1992). L' $\alpha 6\beta 4$ intra-cytoplasmique peut ensuite être soit dégradée ou réutilisée selon les besoins de la cellule (Bretscher, 1992; Gaietta et al., 1994).

Finalement, nos résultats indiquent que la sous-unité $\alpha 6$ s'associe à la sous-unité $\beta 4$ et non la sous-unité $\beta 1$, ce qui confirme le concept qu'en présence de $\beta 1$ et de $\beta 4$, $\alpha 6$ s'associe préférentiellement à $\beta 4$ (Hemler et al., 1989; Giancotti et al., 1992; Gaietta et al., 1994; Kikkawa et al., 2000). Ceci confirme également qu' $\alpha 6$ s'associe avec $\beta 4$ Actd- chez les cellules HIEC normales et les cellules de la crypte intestinale humaine, comme observé préalablement dans les travaux de Basora et al. en 1999.

En tenant compte de tous nos résultats, les quantités d' $\alpha 6\beta 4A$ et d' $\alpha 6\beta 4$ Actd-HA présentes dans nos cellules semblaient donc suffisantes pour utiliser les cellules HIEC $\beta 4A$ et HIEC $\beta 4$ Actd-HA lors de tests d'adhésion.

2. Impacts des intégrines $\alpha 6\beta 4$ A et $\alpha 6\beta 4$ Actd-HA sur l'adhésion des cellules HIEC aux laminines

Depuis sa découverte, l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est reconnue pour être un récepteur des laminines (Niessen et al,1994; Rouselle et Aumailey,1994; Toseran A. et al.,1994; Spinardi et al., 1995). Cependant, les cellules HIEC expriment une variante de la sous-unité $\beta 4$ A, la sous-unité $\beta 4$ Actd-, qui semble inactive pour l'adhésion (Basora et al., 1999). Quel est le rôle de la terminaison du domaine cytoplasmique (ctd) de la sous-unité $\beta 4$ sur les fonctions de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, et surtout, quel est le rôle de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ Actd- dans ces cellules? Pour répondre à ces questions, nous avons vérifié si la perte de la terminaison ctd de la sous-unité $\beta 4$ était responsable de la perte des capacités adhésives d' $\alpha 6\beta 4$ Actd- aux laminines. Nous avons donc utilisé les cellules HIEC $\beta 4$ A, HIEC $\beta 4$ Actd-HA et HIECV lors de tests d'adhésion afin d'établir si la surexpression d'une sous-unité $\beta 4$ A entière dans les cellules HIEC permettrait à ces cellules d'adhérer aux laminines par l'entremise de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ A .

Nos résultats révèlent une meilleure capacité d'adhésion de la part des cellules HIEC $\beta 4$ A comparée aux cellules HIEC $\beta 4$ Actd-HA et HIECV. De plus, en utilisant simultanément les anticorps bloquant les sous-unités $\beta 1$ et $\alpha 6$ dans les mêmes conditions, nous parvenons à ramener les capacités adhésives des trois lignées cellulaires à des niveaux similaires non statistiquement différents. Ceci signifie que la terminaison ctd du domaine cytoplasmique de la sous-unité $\beta 4$ A

joue un rôle important dans les capacités adhésives de l'intégrine $\alpha 6\beta 4A$, et donc, que les cellules HIEC peuvent utiliser cette intégrine pour l'adhésion.

Pour nos tests d'adhésion, nous savions que les cellules HIEC expriment plusieurs intégrines comportant la sous-unité $\beta 1$ (Desloges et al., 1998; Basora et al. 1999) et que plusieurs de ces intégrines sont également des récepteurs des laminines ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 7\beta 1$) (Belkin et Stepp, 2000; Lussier et al., 2000; Plow et al., 2000). Ces informations et les résultats obtenus lors des premiers tests d'adhésion nous indiquent que nous devons, après une adhésion préliminaire sans anticorps bloquants, bloquer l'adhésion médiée par les intégrines formées de la sous-unité $\beta 1$ afin de déceler l'apport de l'intégrine $\alpha 6\beta 4A$ dans l'adhésion des HIEC $\beta 4A$ aux laminines. Pour nous permettre de détecter la meilleure capacité d'adhésion chez les cellules HIEC $\beta 4A$, nous devions donc ajouter l'anticorps mAB13 trente minutes après avoirensemencé nos cellules, sinon, nous n'obtenions aucune différence d'adhésion entre les trois lignées cellulaires. L'adhésion des cellules HIEC médiée par $\alpha 3\beta 1$ sur les laminines ne nécessite pas la coopération de l'intégrine $\alpha 6\beta 4A$ (Basora et al., 1999). Cependant, ceci n'exclue pas la possibilité d'une coopération entre une ou des intégrines formées de la sous-unité $\beta 1$ et l'intégrine $\alpha 6\beta 4A$ dans l'adhésion de cette dernière aux laminines chez les cellules HIEC $\beta 4A$. Ainsi, nos résultats et plusieurs études rapportant des interactions au niveau des voies de signalisation, de la migration et de l'adhésion entre les intégrines formées de la sous-unité $\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ (Mercurio, 1995; Xia et al., 1996; DiPersio et al., 1997;

Gonzales et al., 1999; Honoré et al., 2000; Nguyen et al., 2000; O'Connor et al., 2000; Sterk et al., 2000; Hinterman et al., 2001) nous suggèrent qu'il existe possiblement deux mécanismes de coopération permettant à $\alpha 6 \beta 4 A$ d'adhérer aux laminines. D'abord, l'adhésion initiale aux laminines pourrait être médiée par une ou certaines intégrines formées de la sous-unité $\beta 1$, adhésion qui serait subséquemment transférée à l'intégrine $\alpha 6 \beta 4 A$ dans un processus de remplacement des intégrines impliquées dans la liaison ($\alpha \beta 1 \rightarrow \alpha 6 \beta 4 A$). Ensuite, l'adhésion initiale aux laminines de une ou certaines intégrines formées de la sous-unité $\beta 1$, modifierait l'affinité d' $\alpha 6 \beta 4 A$ pour son ligand selon un mécanisme " outside-in ", ce qui permettrait à $\alpha 6 \beta 4 A$ de se lier par la suite aux laminines. Des phénomènes similaires aux deux mécanismes proposés ont déjà été observés chez d'autres modèles cellulaires, ce qui rend plausible une telle coopération entre ces deux types d'intégrines (Mercurio, 1995; DiPersio et al., 1997; Shattil et Ginsberg, 1997; Sethi et al., 1999; Belkin et Stepp, 2000; Sterk et al., 2000). Toutefois, même si nos résultats suggèrent fortement cette interaction, des travaux plus complets seraient nécessaires afin de la confirmer pleinement et d'identifier les mécanismes impliqués.

Il est difficile d'évaluer le temps nécessaire à l'activation d' $\alpha 6 \beta 4 A$, car nous ne pouvons percevoir l'apport de cette intégrine à l'adhésion avant que l'adhésion médiée par les intégrines formées de la sous-unité $\beta 1$ ne soit suffisamment bloquée. Nos résultats indiquent toutefois qu'elle se produit dans l'intervalle située entre 30 et 90 minutes après l'adhésion initiale des cellules

HIEC β 4A (30 minutes sans mAB13 plus 60 minutes avec mAB13), car dès que l'anticorps bloque adéquatement β 1, c'est-à-dire 60 minutes après son ajout aux puits, nous commençons à percevoir une différence d'adhésion entre les cellules HIEC β 4A et les deux autres lignées cellulaires .

C'est à 120 minutes d'incubation avec l'anticorps mAB13 que nous percevons le mieux la capacité d'adhésion supérieure des cellules HIEC β 4A comparée aux cellules HIECV et HIEC β 4Actd-HA, car c'est à ce temps que le mAB13 produit son effet bloquant maximal. De plus, à 120 minutes les cellules HIEC β 4A présentent possiblement plus d'intégrines α 6 β 4A à leur surface : la liaison d' α 6 β 4A aux laminines prévient l'internalisation, résultant en une augmentation de leur expression à la surface (Bretscher, 1992; Gaietta et al., 1994).

Le fait de pouvoir inhiber l'adhésion supérieure des cellules HIEC β 4A à l'aide de l'anticorps GoH3 dirigé contre la sous-unité α 6, confirme que l'intégrine α 6 β 4A est responsable de leur capacité d'adhésion accrue à la laminine-1. Il aurait été intéressant de pouvoir reproduire cette expérience avec un anticorps dirigé contre la sous-unité β 4. Cependant, l'anticorps 3E1 utilisé précédemment pour bloquer cette sous-unité (Basora et al., 1999; Gauthier et al., 2001b), provoquait une réaction non spécifique sur les cellules HIEC. En effet, suite à l'ajout de cet anticorps, les membranes devenaient fortement irrégulières

(blebbing), ce qui rendait ces cellules non-fonctionnelles pour un test d'adhésion. Nous n'avons pas réussi à trouver la source de ce phénomène.

Il aurait également été intéressant d'effectuer des tests d'adhésion avec la laminine-5 puisque que cette protéine est le ligand principal des intégrines $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ (Carter et al., 1991; Rousselle et al., 1991) et qu'elle ne peut lier les intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ en raison de l'absence du domaine E1 de sa sous-unité α (Belkin et Stepp, 2000). Cependant, elle n'est pas disponible commercialement et les tests préliminaires réalisés avec une laminine-5 obtenue du Dr Burgeson (Basora et al., 1999) n'ont pas été concluants.

Les résultats obtenus lors de nos tests d'adhésion démontrent clairement que les cellules HIEC $\beta 4A$ ont une meilleure capacité d'adhésion aux laminines que les cellules HIECV et les cellules HIEC $\beta 4Actd-HA$. Cependant, la différence d'adhésion observée entre les cellules HIEC $\beta 4A$ et les deux autres lignées cellulaires demeure faible si on compare nos résultats avec les capacités adhésives que l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ exhibe dans d'autres études (Sonnenberg et al., 1990b; Chao et al., 1996; Niessen et al., 1996; Basora et al., 1999; Kikkawa et al., 2000). Pour quelles raisons nos cellules HIEC $\beta 4A$ n'adhèrent-elles pas davantage aux laminines lors de nos tests d'adhésion? Les résultats obtenus lors de nos immunoprécipitations avec GoH3 nous suggèrent que la quantité importante de sous-unité $\beta 4A$ libre dans le cytoplasme de nos cellules HIEC $\beta 4A$ pourrait en être la cause. En effet, comme plusieurs protéines interagissent

directement ou indirectement avec $\alpha 6\beta 4$ via différents mécanismes pour en moduler les fonctions (Giancotti, 1996; Geerts et al., 1999; Nievers et al., 1999; Dans et al., 2000; Mercurio et al., 2001), il est plausible que les sous-unités $\beta 4A$ libres séquestrent une ou plusieurs de ces protéines cytoplasmiques. Conséquemment, ces protéines deviennent moins disponibles pour les intégrines $\alpha 6\beta 4$ transmembranaires (potentiellement fonctionnelles pour l'adhésion), ce qui diminue les capacités d'adhésion des cellules HIEC $\beta 4A$. Une surexpression de la sous-unité $\alpha 6$ pourrait permettre d'équilibrer les quantités d' $\alpha 6$ et de $\beta 4$ afin d'éliminer l'excédent de sous-unité $\beta 4A$ libre du cytoplasme en formant une plus grande proportion d'hétérodimères $\alpha 6\beta 4A$ transmembranaires potentiellement fonctionnelles pour l'adhésion. Pour produire cette surexpression d' $\alpha 6$, nous pourrions utiliser la technique de l'infection rétrovirale du gène d' $\alpha 6$ chez nos cellules surexprimant déjà le $\beta 4A$. La même procédure devrait être appliquée avec les cellules HIEC $\beta 4Actd-HA$ puisque le même problème est observé. Toutefois, dans ce cas, l'augmentation de l'intégrine $\alpha 6\beta 4Actd-HA$ à la surface ne devrait pas produire d'augmentation des capacités d'adhésion des cellules HIEC $\beta 4Actd-HA$, $\alpha 6\beta 4Actd-HA$ étant non-fonctionnelle pour l'adhésion.

3. Rôles du fragment ctd du domaine cytoplasmique de $\beta 4A$

À la lumière des résultats que nous avons obtenus lors de nos tests d'adhésion, nous savons maintenant que la terminaison ctd de la sous-unité $\beta 4A$

joue un rôle très important dans les capacités adhésives de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ A. Bien que notre étude soit la première à démontrer ce phénomène pour $\beta 4$, d'autres travaux ont rapportés que l'extrémité C-terminale du domaine cytoplasmique d'autres sous-unités β des intégrines sont impliquées dans l'affinité de celles-ci pour leur ligands (O'toole et al., 1995; Romzek et al., 1998). Comment l'absence du fragment ctd du long domaine cytoplasmique de la sous-unité $\beta 4$ Actd- rend-elle l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ Actd- non-fonctionnelle pour l'adhésion et quelle fonction cette intégrine occupe-t-elle chez les cellules qui l'expriment? Des indications sur les réponses à ces questions proviennent de différentes études que nous pouvons regrouper en deux domaines différents.

Tout d'abord, il y a les études reliées aux rôles de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ dans l'adhésion. Premièrement, la crypte intestinale ne contient pas de laminine-5 ni de HD1/plectine contrairement à la villosité (Leivo et al., 1996; Orian-Rousseau et al., 1996; Fontao et al., 1999). Ceci signifie que la liaison entre $\alpha 6\beta 4$ et la laminine-5 de même que l'assemblage d'hémidesmosome de type II n'est possible que dans la villosité. Il fut également proposé que le repliement causé par l'association entre la terminaison ctd et le segment connecteur du domaine cytoplasmique de la sous-unité $\beta 4$ serait impliqué dans la régulation de la formation des hémidesmosomes, lorsque l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ n'est pas liée aux laminines (Shaapveld et al., 1999; Nievers et al., 2000). Ce repliement aurait donc possiblement un rôle dans la fonctionnalité de cette intégrine. Or, nous savons également que l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ Actd- ne possède pas les derniers 20-30

acides aminés impliqués dans ce repliement du domaine cytoplasmique de la sous-unité $\beta 4A$ et ne semble pas fonctionnelle pour l'adhésion aux laminines (Cette étude, Basora et al., 1999). Il serait donc plausible que la perte de ces 20-30 acides aminés soit reliée à la perte des capacités d'adhésion aux laminines d' $\alpha 6\beta 4A^{ctd-}$, car il existe des exemples où l'inhibition conformationnelle d'une protéine est un moyen de réguler sa capacité à interagir avec d'autres protéines (Pen et al., 1990; Johnson et Craig, 1995; Gilmore. et Burridge, 1996, Bretscher et al., 1997). Ainsi, $\alpha 6\beta 4A^{ctd-}$ serait une forme inactive de l'intégrine pour l'adhésion.

Ensuite, il y a les études reliées aux rôles de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ dans la signalisation. D'abord, la stimulation avec l'EGF du récepteur de l'EGF peut provoquer la phosphorylation, via Fyn, de certaines tyrosines spécifiques du domaine cytoplasmique de la sous-unité $\beta 4$ impliquées dans la signalisation sans que l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ ne soit activée par un ligand extracellulaire (Dans et al., 2001; Mariotti et al., 2001). Ensuite, les cellules prolifératives de la crypte expriment beaucoup plus fortement le récepteur de l'EGF que les cellules de la villosité dans l'intestin grêle humain (Playford et al., 1996; Chailler et Ménard., 1999). Ceci rend donc possible une coopération théorique entre $\alpha 6\beta 4^{ctd-}$ et le récepteur de l'EGF au niveau de la crypte intestinale pour l'activation de voies de signalisation par cette intégrine sans qu'elle ne soit liée à un ligand. Une autre étude rapporte que des souris n'exprimant pas le domaine cytoplasmique de la sous-unité $\beta 4$ exhibent des déficiences prolifératives au niveau des cellules de

leurs compartiments prolifératifs intestinaux (Murgia et al., 1998). $\alpha6\beta4$ aurait donc un rôle certains dans la prolifération des cellules intestinales. Enfin, les intégrines $\alpha6\beta4A$ et $\alpha6\beta4Actd-$ ne sont pas impliquées dans la survie cellulaire des cellules intestinales indifférenciées (Gauthier et al., 2001b). Ainsi $\alpha6\beta4Actd-$ serait impliquée dans une signalisation distincte de celle utilisée pour la survie cellulaire.

Ces études et nos résultats considérés dans leur ensemble suggèrent qu'au niveau des cellules de la crypte intestinale, $\alpha6\beta4Actd-$ ne serait pas impliquée dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire, mais serait par contre potentiellement engagée dans la signalisation cellulaire autre que pour la survie. D'une part, l'absence de la terminaison ctd empêcherait le lien avec le segment connecteur et donc, le repliement de la dernière paire de répétitions fibronectines type III de la sous-unité $\beta4Actd-$. Ceci pourrait conférer à l'intégrine $\alpha6\beta4Actd-$ une conformation inhibant sa capacité à lier les laminines. D'autre part, le domaine cytoplasmique de la sous-unité $\beta4Actd-$ étant moins encombré et adoptant une autre conformation, il pourrait permettre la phosphorylation constitutive de ses tyrosines impliquées dans la signalisation (Mariotti et al., 2001). Cette hypothèse est également renforcée par les études de Dans et al. et de Mariotti et al. en 2001 qui indiquent que les rôles de l'intégrine $\alpha6\beta4$ envers la signalisation et l'adhésion stable (hémidesmosome) sont mutuellement exclusifs.

Les voies de signalisations activées par $\alpha6\beta4$ Actd- pourraient être préférentiellement celles de type prolifératives en raison du statut prolifératif des cellules cryptales intestinales (Gordon et Hemiston, 1994). Cette possibilité pourrait être renforcée par la démonstration d'une coopération d' $\alpha6\beta4$ Actd- avec le récepteur de l'EGF (Treisman, 1995; Mainiero et al., 1997; Dans et al., 2001; Mariotti et al., 2001) dans ces cellules. Pour ce qui est du rôle d' $\alpha6\beta4$ Actd- dans les voies impliquées dans la différenciation chez l'humain, l'absence de la terminaison ctd pourrait être un moyen d'empêcher la liaison d' $\alpha6\beta4$ Actd- aux laminines de la crypte et ainsi d'inhiber la participation potentielle d' $\alpha6\beta4$ A dans la différenciation suite à sa liaison à un ligand. En effet, le long de l'axe crypte-villosité et in vitro, la liaison à la laminine-10 concorde avec les niveaux de différenciation des cellules (Vachon et Beaulieu, 1995). L'expression différentielle d' $\alpha6\beta4$ A et d' $\alpha6\beta4$ Actd- le long de l'axe crypte-villosité (Basora et al., 1999), pourrait bien être aussi impliquée dans les mécanismes menant à la différenciation des cellules de cet axe. En effet, nous savons que les rôles de l'intégrine $\alpha6\beta4$ envers l'adhésion stable et la signalisation sont mutuellement exclusifs (Dans et al., 2001; Mariotti et al., 2001). Il est alors intéressant de faire un rapprochement entre l'apparition d'hémidesmosomes de type II au niveau des villosités et l'état de différenciation des cellules le long de l'axe crypte-villosité.

En terminant, il est surprenant de retrouver l'intégrine $\alpha6\beta4$ Actd- localisée à la base des cellules épithéliales de la crypte (Basora et al., 1999) compte tenu qu' $\alpha6\beta4$ Actd- n'est pas fonctionnelle pour l'adhésion et que ces cellules

n'expriment pas les protéines HD1/plectine, BP180 et BP230. En effet, jusqu'à maintenant la littérature rapporte que la localisation ligand indépendante de l'intégrine $\alpha6\beta4$ à la base des cellules ne peut s'accomplir qu'en coopération avec les composants hémidesmosomales (Nievers et al., 2000). L'intégrine $\alpha6\beta4$ Actd- peut-elle lier un constituant autre que les laminines dans la matrice extracellulaire ou encore peut-elle lier les laminines sans apporter aucune contribution à l'adhésion? Encore une fois, seuls des études approfondies pourraient nous apporter des réponses à une telle éventualité.

V-Conclusions

Au cours de cette étude nous avons généré deux modèles cellulaires, les cellules HIEC β 4A et les cellules HIEC β 4Actd-HA qui nous ont permis d'identifier formellement la terminaison ctd du domaine cytoplasmique de la sous-unité β 4A comme étant très importante pour le rôle dans l'adhésion de l'intégrine α 6 β 4A. Au cours de cette étude, nous avons également démontré fonctionnellement que l'intégrine α 6 β 4Actd- est une variante d' α 6 β 4A inactive pour l'adhésion aux laminines (Basora et al., 1999). Finalement, suite à nos observations, nous avons émis l'hypothèse d'une possible coopération entre l'intégrine α 6 β 4A et une ou des intégrines non-identifiées composées de la sous-unité β 1 dans l'activation des capacités adhésives d' α 6 β 4A chez les cellules HIEC β 4A. Nos résultats obtenus avec les cellules HIEC β 4A et HIEC β 4Actd-HA nous donnent de précieuses informations sur les rôles limités de l'intégrine α 6 β 4Actd- envers l'adhésion, donc sur ses rôles potentiels au niveau de la signalisation dans la crypte intestinale humaine. Toutefois, les fonctions d' α 6 β 4A et d' α 6 β 4Actd- dans la signalisation cellulaire le long de l'axe crypte villosité demeurent peu connues. Des cellules HIEC surexprimant la sous-unité α 6 dans des proportions équivalentes aux sous-unités β 4A et β 4Actd-HA, de même que des cellules Caco-2/15 surexprimant l'intégrine α 6 β 4A et un dominant négatif de ces cellules surexprimant l'intégrine α 6 β 4Actd-HA, constitueraient d'excellents outils pour élucider ces fonctions. Par exemple, ces cellules pourraient être cultivées à

court, moyen et long terme sur différentes laminines ce qui nous permettrait d'observer les effets de l'expression différentielle des deux isoformes d' $\alpha 6 \beta 4$ sur la prolifération et la différenciation. Éventuellement, le discernement des différentes fonctions d' $\alpha 6 \beta 4A$ et d' $\alpha 6 \beta 4Actd$ - sur ces voies de signalisation au niveau de l'intestin humain pourrait certainement contribuer à la compréhension globale des mécanismes qui régissent cet organe en conditions normales et pathologiques.

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mes co-directeurs de recherche, les Drs Jean-François Beaulieu et Pierre H. Vachon, pour leur confiance et pour m'avoir permis de travailler sur un projet très intéressant. Je remercie également le Dr Dominique Jean et Elizabeth Herring pour leur aide et leurs précieux conseils. Je salue le personnel et les étudiants du département ABC et plus spécialement mes confrères de laboratoire avec qui j'ai eu beaucoup plaisir à étudier. En terminant, j'exprime toute ma gratitude aux membres de ma famille ainsi qu'à ma copine Marilyn pour leurs encouragements et leur soutien durant cette maîtrise.

Bibliographie

Adams J.C. et Watt F.M. Regulation of the development and differentiation by the extracellular matrix. *Development*. 117:1183-1198,1993.

Akiyama S.K., Yamada S.S. Chen W.T. et Yamada K.M. Analysis of fibronectin receptor function with monoclonal antibodies: roles in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organization. *J. Cell. Biol.* 105:863-875,1989

Alt A., Ohba M., Li L., Gartsbein M., Belanger A., Denning M.F., Kuroki T., Yuspa S.H. et Tennenbaum T. Protein kinase Cdelta-mediated phosphorylation of alpha6beta4 is associated with reduced integrin localization to the hemidesmosome and decreased keratinocyte attachment. *Cancer Res.* 61(11):4591-4598,2001.

Bachelder R.E., Marchetti A., Falcioni R., Soddu S. et Mercurio A.M. Activation of p53 function in carcinoma cells by the alpha6beta4 integrin. *J. Biol. Chem.* 274(29):20733-20737,1999a.

Bachelder R.E., Ribick M.J., Marchetti A., Falcioni R., Soddu S., Davis K.R. et Mercurio A.M. p53 inhibits alpha6beta4 integrin survival signaling by promoting the caspase 3-dependent cleavage of AKT/PKB. *J. Cell. Biol.* 147(5):1063-1072,1999b.

Basora N. Herring-Gillam F.E., Boudreau F., Perreault N., Pageot L.P., Simoneau M., Bouatrouss Y. et Beaulieu J.F. Expression of functionally distinct variants of the beta4A integrin subunit in relation to the differentiation state in human intestinal cells. *J. Biol. Chem.* 74(42):29819-29825,1999.

Beaulieu J.F. et Quaroni A. Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Biochem. J.* 280:599-608,1991.

Beaulieu J.F. et Vachon P.H. Reciprocal expression of laminin A-Chain isoforms along the crypt-villus axis in the human small intestine. *Gastroenterology* 106:829-839,1994.

Beaulieu J.F. Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation. *Progr. Histochem. Cytochem.* 31(4):1-78,1997.

Beaulieu J.F. Integrin and human intestinal cell functions. *Front. Biosci.* 15(4):D310-D321,1999.

Belkin A.M. et Stepp M.A. Integrins as receptors for laminins. *Microsc. Res. Tech.* 51:280-301,2000.

Boucher M.J., Morisset J., Vachon P.H., Reed J.C., Lainé J. et Rivard N. MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 79(3):355-369,2000.

Bretscher M.S. Circulating integrins: alpha5beta1, alpha6beta4 and Mac-1, but not alpha3beta1, alpha4beta1 or LFA-1. *EMBO J.* 11(2):405-410,1992.

Bretscher A., Reczek D. et Berryman M. Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures. *J. Cell. Sci.* 110 (Pt24):3011-3018,1997.

Burrige K., Fath K., Kelly T., Nuckolls G et Turner C. Focal adhesions: Transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:487-525,1988.

Carter W.G., Ryan M.C. et Gahr P.J. Epiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin alpha3beta1 in epithelial basement membranes. *Cell.* 65(4):599-610,1991.

Chailier P. et Ménard D. Ontogeny of EGF receptors in the human gut. *Front. Biosci.* 4:D87-101,1999.

Champlaud M.-F.,Lunstrum G.P., Rousselle P., Nishiyama T., Keene D. et Burgeson R.E. Human amnion contains a novel laminin variant, laminin-7, which like laminin-6, covalently associates with laminin-5 to promote stable epithelial-stromal attachment. *J Cell Biol.* 132(6):1189-1198,1996.

Chao C., Lotz M.M., Clarke A.C. et Mercurio A.M. A function for the integrin alpha6beta4 in the invasive properties of colorectal carcinoma cells. *Cancer Res.* 56(20):4811-4819,1996.

Chen C.A. et Okayama H. Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques.* 6(7):632-638,1988.

Clarke A.S., Lotz M.M. et Mercurio A.M.. A novel structural variant of the human beta4 integrin cDNA. *Cell Adhesion Comm.* 2:1-6,1994.

Clarke A.S., Lotz M.M., Chao C. et Mercurio A.M. Activation of the p21 pathway of growth arrest and apoptosis by the beta4 integrin cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* 270(39):22673-22676,1995.

Colbere-Garapin F., Garapin A.C. Gene transfer into mammalian cells. *Dev. Biol. Stand.* 55:267-271,1983.

Colosimo A., Goncz K.K., Holmes A.R., Kunzelmann K., Novelli G., Malone R.W., Bennett M.J. et Gruenert D.C. Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *Biotechniques.* 29(2):314-318,320-324,2000

Cowley S., Paterson H., Kemp P et Marshall C.J. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77(6):841-852,1994.

Dans M., Gagnoux-Palacios L., Blaiekie P., Klein S., Mariotti A. et Giancotti F.G. Tyrosine phosphorylation of the beta4 integrin cytoplasmic domain mediates Shc signaling to extracellular signal-regulated kinase and antagonizes formation of hemidesmosomes. *J. Biol. Chem.* 276(2):1494-1502,2001.

De Melker A.A. et Sonnenberg A. Integrins: Alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. *BioEssays.* 21:499-509,1999.

Desloges N., Basora N., Perreault N., Bouatrouss Y., Sheppard D., et Beaulieu J.F. Regulated expression of the integrin alpha9beta1 in the epithelium of the developing human gut and in intestinal cell lines: relation with cell proliferation. *J Cell. Biochem.* 71(4):536-45,1998.

DiPersio C.M., Hodivala-Dilke K.M., Jaenisch R., Kreidberg J.A. et Hynes R.O. Alpha3beta1 Integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane. *J. Cell. Biol.* 137(3):729-42,1997.

Dowling J., Quian-Chun Y. et Fuchs E. Beta4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival. *J. Cell Biol.* 134(2):559-572,1996.

Engvall E. Laminin variants: why, where, and when? *Kidney Int.* 43:2-6,1993

Engvall E. et Wewer U.M. Domain of laminin. *J. Cell. Biochem.* 61:493-501,1996.

Fontao L., Dirrigns S., Owaribe K., Kedingner M. et Launey J.F. Polarized expression of HD1: relationship with the cytoskeleton in cultured human colonic carcinoma cells. *Exp. Cell. Res.* 231(2):319-327,1997.

Fontao L., Stutzmann J., Gendry P. et Launay J.F. Regulation of the type II hemidesmosomal plaque assembly in intestinal epithelial cell. *Exp. Cell. Res.* 250:298-312,1999.

Fontao L., Geerts D., Kuikman I., Koster J., Kramer D. et Sonnenberg A. The interaction of plectin with actin: evidence for cross-linking of actin filaments by dimerization of the actin-binding domain of plectin. *J. Cell. Sci.* 114(11):2065-2076,2001.

Fornaro M. et Languino L.R. Alternatively spliced variants: a new view of the integrin cytoplasmic domain. *Matrix Biol.* 16:185-193,1997.

Frisch S.M. et Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell. Biol.* 124(4):619-626,1994.

Fuchs E., Dowling J., Segre J., Lo S.H. et Yu Q.C. Integrators of epidermal growth and differentiation: distinct functions for beta1 and beta4 integrins. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 7:672-682,1997.

Gaietta G., Redelmeier T.E., Jackson M.R., Tamura R.N. et Quaranta V. Quantitative measurement of alpha6beta1 and alpha6beta4 integrin internalization under cross-linking conditions: a possible role for alpha6 cytoplasmic domains. *J. Cell. Sci.* 107(Pt 12):3339-3349,1994

Gamballeta D., Marchetti A., Benedetti L., Mercurio A.M., Sachhi A. et Falcioni R. Cooperative signaling between $\alpha 6 \beta 4$ integrin and erbB-2 receptor is required to promote phosphatidylinositol 3-kinase-dependent invasion. *J. Biol. Chem.* 275(14):10604-10610,2000.

Gauthier R., Laprise P., Cardin E., Harnoi C., Plourde A., Reed J.C., Vezina A. et Vachon P.H. Differential sensitivity to apoptosis between the human small and large intestinal mucosae: linkage with segment-specific regulation of BCL-2 homologs and involvement of signaling pathways. *J. Cell. Biochem.* 82(2):339-355,2001a.

Gauthier R., Harnoi C., Drolet J.F., Reed J.C., Vezina A. et Vachon P.H. Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 280(6):1540-1554,2001b.

Geerts D., Fontao L., Nievers M.G., Schaapveld R.Q., Purkis P.E., Wheeler G.N., Lane E.B., Leigh I.M. et Sonnenberg A. Binding of integrin alpha6beta4 to plectin prevents plectin association with F-actin but does not interfere with intermediate filament binding. *J. Cell. Biol.* 147(2):417-434,1999.

Georges-Labouesse E., Messaddeq N., Yehia G., Cadalbert L., Dierich A. et Le Meur M. Absence of integrin alpha6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice. *Nat. Genet.* 13(3):370-373,1996.

Giancotti F. G., Stepp M.A., Suzuki S., Engvall E., et Ruoslahti E. Proteolytic processing of endogenous and recombinant beta4 integrin subunit. *J. Cell. Biol.* 118:951-959,1992

Giancotti F.G. Signal transduction by the alpha6beta4 integrin: charting the path between laminin binding and nuclear events. *J. Cell. Sci.* 109 (Pt6):1165-1172,1996.

Giancotti F.G. Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:691-700,1997.

Giancotti F.G. et Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 285:1028-1032,1999.

Gibson I.K., Spurr-Michaud S., Tisdale A., Elwell J. et Stepp M.A. Redistribution of the hemidesmosome components alpha6beta4 integrin and bullous pemphigoid antigens during epithelial wound healing. *Exp. Cell. Res.* 207(1):86-98,1993.

Gilmore A.P. et Burridge K. Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate. *Nature* 381(6582):531-55,1996.

Goldfinger L.E., Hopkinson S.B., deHart G.W., Collawn S., Couchman J.R. et Jones J.C. The alpha3 laminin subunit, alpha6beta4 and alpha3beta1 integrin coordinately regulate wound healing in cultured epithelial cells and in the skin. *J. Cell. Sci.* 112 (16):2615-2629,1999..

Gonzales M., Haan K., Baker S.E., Fitchmun M., Todorov I., Weitzman S. et Jones J.C. A cell signal pathway involving laminin-5, alpha3beta1 integrin, and mitogen-activated protein kinase can regulate epithelial cell proliferation. *Mol. Biol. Cell.* 10(2):259-270,1999

Gordon J.I. et Hermiston M.L. Differentiation and self-renewal in the mouse gastrointestinal epithelium. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:795-803,1994.

Hauptmann S., Denkert C., Lohrke H., Tietze L., Ott S., Klosterhalfen B. et Mittermayer C. Integrin expression on colorectal tumor cells growing as monolayers, as multicellular tumor spheroids, or in nude mice. *Int J. Cancer* 61(6):819-825,1995.

Hemler M.E., Crouse C., Takada Y. et Sonnenberg A. Multiple very late antigen (VLA) heterodimers on platelets. *J. Biol. Chem.* 264:6529-6535,1988.

Hemler M.E., Crouse C. et Sonnenberg A. Association of the VLA alpha6 subunit with a novel protein. *J. Biol. Chem.* 264(11):6529-6535, 1989.

Hessle H., Sakai L.Y., Hollister D.W., Burgeson R.E. et Engvall E. Basement membrane diversity detected by monoclonal antibodies. *Differentiation*. 26(1):49-54,1984.

Hieda Y., Nishizawa Y., Uematsu J. et Owaribe K. Identification of a new hemidesmosomal protein, HD1: a major, high molecular mass component of isolated hemidesmosomes. *J. Cell. Biol.* 116(6):1497-1506,1992.

Hinterman E., Bilban M., Sharabi A. et Quaranta V. Inhibitory role of alpha6beta4-associated erbB-2 and phosphoinositide 3-kinase in keratinocyte haptotactic migration dependent on alpha3beta1 integrin. *J. Cell. Biol.* 153(3):465-478,2001.

Hogervorst F., Kuikman I., Von Dem Borne A.E.G.Kr. et Sonnenberg A. Cloning and sequence analysis of beta4 cDNA: an integrin subunit that contains a unique 118 kd cytoplasmic domain. *Embo J.* 9(3):765-790,1990.

Hogervorst F., Kuikman I., van Kessel A.G et Sonnenberg A. Molecular cloning of the human alpha6 mRNA and chromosomal localization of the alpha6 and beta4 genes. *Eur. J. Biochem.* 199(2):425-433,1991

Hogervorst F., Admiraal L.G., Niessen C., Kuikman I., Janssen H., Daam H. et Sonnenberg A. Biochemical characterization and tissue distribution of the A and B variants of the integrin alpha6 subunit. *J. Cell. Biol.* 121;179-191,1993.

Honore S., Pichard V., Penel C., Rigot V., Prévôt C., Marvaldi J., Briand C. et Rognoni J.B. Outside-in regulation of integrin clustering processes by ECM components per se and their involvement in actin cytoskeleton organization in a colon adenocarcinoma cell line. *Histochem. Cell. Biol.* 114(4):323-335,2000

Hynes R.O. Integrins , a family of cell surface receptors. *Cell* 48:549-554,1987.

Hynes R.O. Cell adhesion: Old and new questions. *Trends Cell Biol.* 9:M33-M37,1999a.

Hynes R.O. The dynamic dialog between cells and matrices: implications of fibronectin's elasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2588-2590,1999b

Johnson R.P. et Craig S.W. F-actin binding site masked by the intramolecular association of vinculin head and tail domains. *Nature.* 373(6511):261-264,1995.

Jones B.A. et Gores G.J. Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine. *Am. J. Physiol.* 273:G1174-G1188,1997.

Kajiji S., Davceva B. et Quaranta V. Six monoclonal antibodies to human pancreatic cancer antigens. *Cancer Res.* 47(5):1367-76,1997.

Kajiji S., Tamura R.N. et Quaranta V. A novel integrin (α E β 4) from human epithelial cells suggests a fourth family of integrin adhesion receptors. *Embo J.* 8(3):673-680,1989.

Kennel S.J. Characterization of a tumor cell surface protein with heterologous antisera to a spontaneous BALB/c lung carcinoma. *Cancer Res.* 39(8):2934-2939,1979.

Kennel S.J., Foote L.J., Falcioni R. Sonnenberg A. Stringer C.D., Crouse C. et Hemler M.E. Analysis of the tumor-associated antigen TSP-180: Identity with α 6 β 4 in the integrin superfamily. *J Biol Chem.* 264(26):15515-21, 1989.

Kikkawa Y., Sanzen N., Fujiwara H., Sonnenberg A. et Sekiguchi K. Integrin binding specificity of laminin-10/11: laminin-10/11 are recognized by α 3 β 1, α 6 β 1 and α 6 β 4 integrins. *J. Cell. Sci.* 113(Pt5):869-876,2000.

Kimmel K.A. et Carey T.E. Altered expression in squamous carcinoma cells of an orientation restricted epithelial antigen detected by monoclonal antibody A9. *Cancer Res.* 46(7):3614-23,1986.

Kumar C.C. Signaling by integrin receptors. *Oncogene.* 17:1365-1373,1998.

Leblond C.P. The life history of cells in renewing systems. *Am. J. Anat.* 160:114-159,1981.

Leivo I., Tani T., Laitinen L., Bruns R., Kivilaakso E., Lehto V.P., Burgeson R.E. et Virtanen I. Anchoring complex components laminin-5 and type VII collagen in intestine: association with migrating and differentiating enterocytes. *J Histochem. Cytochem.* 44(11):1267-77,1996.

Lotz M.M., Rabinovitz I. et A.M. Mercurio. Intestinal restitution: progression of actin cytoskeleton rearrangements and integrin function in a model of epithelial wound healing. *Am. J. Pathol.* 156(3):985-996,2000.

Louvard D., Keding M., et H.-P. Hauri. The differentiating intestinal epithelial cell : Establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:157-195, 1992.

Lussier C., Basora N., Bouatrouss Y. et Beaulieu JF. Integrins as mediators of epithelial cell matrix interactions in th human small intestinal mucosa. *Microsc. Res. Tech.* 51(2):169-178,2000.

Mainiero F., Pepe A., Kishore K., Spinardi L., Mohammadi M., Schlessinger J. et Giancotti G. Signal transduction by the alpha6beta4 integrin: distinct beta4 subunit sites mediate recruitment of Shc/Grb2 and association with the cytoskeleton of hemidesmosomes. *EMBO J.* 14(18):4470-4481,1995.

Mainiero F., Murgia C., Wary K.K., Curatola A.M., Pepe A., Blumberg M., Weswick J.K., Der C.J. et Giancotti F.G. The coupling of alpha6beta4 integrin to Ras-MAP kinase pathways mediated by Shc controls keratinocyte proliferation. *EMBO J.* 16(9):2365-2375,1997.

Mariotti A., Kedeshian P.A., Dans M., Curatola A.M., Gagnoux-Palacios L. et Giancotti F.G. EGF-R signaling through Fyn kinase disrupts the function of integrin alpha6beta4 at hemidesmosomes: role in epithelial cell migration and carcinoma invasion. *J. Cell. Biol.* 155(3):447-457,2001.

Masunaga T., Shimizu H., Ishiko A., Tomita Y., Aberdam D., Ortonne J.P. et Nishikawa T. Localization of laminin-5 in the epidermal basement membrane. *J Histochem. Cytochem.* 44(11):1223-1230,1996.

Ménard D. et Beaulieu J.-F. Human intestinal brush border membrane hydrolase. *Membrane Physiopathology*. G. Bakaly, Ed. Kluwer Academic Press, Norwell, MA, pp. 319-341,1994.

Mercurio A.M. Laminin receptors: achieving specificity through cooperation. *Trends Cell. Biol.* 5:419-423,1995.

Mercurio A.M., Rabinovitz I. et Shaw L.M. The alpha6beta4 integrin and epithelial cell migration. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13(5):541-545,2001.

Mercurio A.M. et Rabinovitz I. Towards a mechanistic understanding of tumor invasion-lessons from the alpha6beta4 integrin. *Semin. Cancer Biol.* 11(2):129-141,2001.

Miao J.Y., Akari S., Kaji K. et Hayashi H. Integrin beta4 is involved in apoptotic signal transduction in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233(1):182-6,1997.

Morgenstern J.P. et Land H. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res.* 18(12):3587-3596,1990.

Murgia C., Blaikie P., Kim N., Dans M., Petrie H.T. et Giancotti F.G. Cell cycle and adhesion defects in mice carrying a targeted deletion of the integrin beta4 cytoplasmic domain. *EMBO J.* 17(14):3940-3951,1998

Nguyen B.P., Ryan M.C., Gil S.G. et Carter W.G. Deposition of laminin 5 in epidermal wounds regulates integrin signaling and adhesion. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 12(5):554-562,2000.

Niessen C.M., Hogervorst F., Jaspars L.H., de Melker A.A., Delwel G.O., Hulsman E.H.M., Kuikman I. et Sonnenberg A. The alpha6beta4 integrin is a receptor for both laminin and kalinin. *Exp. Cell. Res.* 211(2):360-367,1994.

Niessen C.M., van der Raaij-Helmer L.M.H., Hulsman E.H.M., Van der Neut R., Jonkman M.F. et Sonnenbrg A. Deficiency of the integrin beta4 subunit in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia: consequences for hemidesmosome formation and adhesion properties. *J. Cell. Sci.* 109(7):1695-1706,1996.

Nievers M.G., Schaapveld R.Q., Oomen L.C., Fontao L., Geerts D. et Sonnenberg A. Ligand-independent role of the beta4 integrin subunit in the formation of hemidesmosomes. *J. Cell. Sci.* 111:1659-1672,1998.

Nievers M.G., Schaapveld R.Q. et Sonnenberg A. Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix Biol.* 18(1):5-17,1999.

Nievers M.G., Kuikman I., Geerts D., Leigh I.M. et Sonnenberg A. Formation of hemidesmosome-like structures in the absence of ligand binding by the alpha6beta4 integrin requires binding of HD1/plectin to the cytoplasmic domain of the beta4 integrin subunit. *J. Cell. Sci.* 113 (Pt6):963-973,2000.

O'Connor K.L., Shaw L.M. et Mercurio A.M. Release of cAMP gating by the alpha6beta4 integrin stimulates lamellae formation and the chemotactic migration of invasive carcinoma cells. *J. Cell. Biol.* 143(6):1749-1760,1998.

O'Connor K.L., Nguyen B.K. et Mercurio A.M. RhoA function in lamellae formation and migration is regulated by the alpha6beta4 integrin and cAMP metabolism. *J. Cell. Biol.* 148(2):253-258,2000.

Orian-Rousseau V., Aberdam D., Fontao L., Chevalier L., Menguzzi G., Kedingner M. et Simon-Assmann P. Developmental expression of laminin-5 and HD1 in the intestine: epithelial to mesenchymal shift for the laminin gamma-2 chain subunit deposition. *Dev. Dyn.* 206(1):12-23,1996.

O'toole T.E., Ylanne J. et Culley B.M. Regulation of integrin affinity states through an NPXY motif in the beta subunit cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* 270(15):8553-8558,1995.

Perreault N., P.H. Vachon et J.-F. Beaulieu. Appearance and distribution of laminin A chain isoforms and integrin alpha2, alpha3, alpha6, beta1, and beta4

subunits in the developing human small intestinal mucosa. *Anat. Rec.* 242; 242-250,1995.

Perreault N. et J.-F. Beaulieu. Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp. Cell. Res.* 224(2):354-364,1996.

Peterson G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83(2):346-56,1977.

Penn L.J., Brooks M.W., Laufer E.M., Littlewood T.D., Morgenstern J.P., Evan G.I., Lee W.M. et Land H. Domains of human c-myc protein required for autosuppression and cooperation with ras oncogenes are overlapping. *Mol. Cell. Biol.* 10(9):4961-4966,1990.

Playford R.J., Hanby A.M., Gschmeissner S., Peiffer L.P., Wright N.A. et McGarrity T. The epidermal growth factor receptor (EGF-R) is present on the basolateral, but not the apical, surface of enterocytes in the human gastrointestinal tract. *Gut.* 39(2):262-266,1996.

Plow E.F. et al. Ligand binding to integrins. *J. Biol. Cell.* 276(29):21785-21788, 2000.

Potten C.S. Epithelial cell growth and differentiation II. Intestinal apoptosis. *Intestinal apoptosis.* *Am. J. Physiol.* 273:G253-G257, 1997.

Poumay Y., Leclercq-Smekens M., Grailly S., Degen A. et Leloup R. Specific internalization of basal membrane domains containing the integrin $\alpha 6 \beta 4$ in disperse-detached cultured human keratinocytes. *Eur. J. Cell. Biol.* 60(1):12-20,1993.

Pulkkinen L., Kurtz K., Xu Y., Bruckner-Tuderman L. et Uitto J. Genomic organization of the integrin $\beta 4$ gene ITGB4: a homozygous splice-site mutation in a patient with junctional epidermolysis bullosa associated with pyloric atresia. *Lab invest.* 76:823-833,1997a.

Pulkkinen L., Kimonis V.E., Xu Y., Spanou E.N. McLean W.H.I. et Uitto J. Homozygous $\alpha 6$ integrin mutation in junctional epidermolysis bullosa with congenital duodenal atresia. *Hum. Mol. Genet.* 6:669-674,1997b.

Rabinovitz I. et Mercurio A.M. The integrin $\alpha 6 \beta 4$ functions in carcinoma cell migration on laminin-1 by mediating the formation and stabilization of actin-containing motility structures. *J. Cell. Biol.* 139(7):1873-1884,1997.

Rabinovitz I., Toker A. et Mercurio A.M. Protein kinase C-dependent mobilization of the $\alpha 6 \beta 4$ integrin from hemidesmosomes and its association with actin-

rich cell protusions drive the chemotactic migration of carcinoma cells. *J. Cell. Biol.* 146(5):1147-1159,1999.

Reddy D., Muller P., Tran H. et al. The extracellular domain of BP180 binds laminin-5. *J. Invest. Dermatol.* 110:593a,1998

Rezniczek G.A. de Pereda J.M., Reipert S. et Wiche G. Linking integrin alpha6beta4-based cell adhesion to the intermediate filament cytoskeleton: direct interaction between the beta4 subunit and plectin at multiple molecular sites. *J. Cell. Biol.* 141(1):209-25,1998.

Rigot V., André F., Lehmann M., Lissitzky J.-C., Marvaldi J. et Luis J. Biogenesis of alpha6beta4 integrin in a human colonic adenocarcinoma cell line. *Euro. J. Biochem.* 261(3):659-666,1999.

Romzek N.C., Harris E.S., Dell C.L., Skronek J., Hasse E., Reynolds P.J., Hunt S.W. 3rd et Shimizu Y. Use of a beta1 integrin-deficient human T cell to identify beta1 integrin cytoplasmic domain sequences critical for integrin function. *Mol. Biol. Cell.* 9(10):2715-2727,1998.

Rosekelly C.D., Desprez P.Y. et Bissel M.J. A hierarchy of ECM-mediated signaling regulates tissue-specific gene expression. *Cur. Opin. Cell Biol.* 7:736-747,1997.

Rousselle P., Lunstrum G.P., Keene D.R. et Burgeson R.E. Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J. Cell. Biol.* 114(3):567-576,1991.

Rousselle P. et Aumailley M. Kalinin is more efficient than laminin in promoting adhesion of primary keratinocytes and some other epithelial cells and has a different requirement for integrin receptors. *J. Cell. Biol.* 125(1):205-214,1994.

Rousselle P., Golbik R., van der Rest M. et Aumailley M. Structural requirement for cell adhesion to kalinin (laminine-5). *J. Biol. Chem.* 270:13766-13770,1995.

Rousselle P., Keene D.R., Ruggiero F., Champliand M.-F., van der Rest M. et Burgeson R.E. Laminin-5 binds the NC-1 domain of type VII collagen. *J Cell Biol.* 138(3):719-28, 1997.

Ruhrberg C. et Watt F.M. The plakin family: versatile organizers of cytoskeletal architecture. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7:392-397,1997.

Schaapveld R.Q.J., Borradori L., Geerts D., van Leusden M.R., Kuikman I., Nievers M.G., Niessen C.M., Steenbergen R.D.M., Snijders P.J.F. et Sonnenberg A. Hemidesmosome formation is initiated by the beta4 integrin subunit, requires complex formation of beta4 and HD1/plectin, and involves a direct interaction

between beta4 and the bullous pemphigoid antigen 180. J. Cell. Biol. 142(1):271-284,1998.

Sethi T., Ginsberg M.H., Downward J. et Hughes P.E. The small GTP-binding protein R-Ras can influence integrin activation by antagonizing a Ras/Raf-initiated integrin suppression pathway. Mol. Biol. Cell. 10(6):1799-1809,1999.

Shattil S.J. et Ginsberg MH. Integrin signaling in vascular biology. J. Clin. Invest. 100(11 Suppl):S91-95,1997.

Shaw L.M., Rabinovitz I., Wang H.H., Toker A. et Mercurio A.M. Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the alpha6beta4 integrin promotes carcinoma invasion. Cell. 91(7):949-960,1997.

Shaw L.M. Identification of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 as signaling intermediates in the alpha6beta4 integrin-dependent activation of phosphoinositide 3-OH kinase and promotion of invasion. Mol. Cell. Biol. 21(15):5082-5093,2001.

Simon-Assmann P., B. Duclos, V. Orian-Rousseau, C. Arnold, C. Mathelin, E. Engvall et M. Kedingier. Differential expression of laminin isoforms and alpha6-beta4 integrins subunits in the developing human and mouse intestine. Dev. Dyn. 201:71-85,1994.

Skalli O., Jones J.C.R., Gagescu R. et Goldman R.D. IFAP 300 is common to desmosomes and hemidesmosomes and is a possible linker of intermediate filaments to these junctions. J. Cell. Biol. 125(1):159-170,1994.

Sonnenberg A, Janssen, H., Hogervorst F., Calafat J. et Hilgers, J. A complex of platelet glycoproteins Ic and IIa identified by a rat monoclonal antibody. J. Biol. Chem. 262:10376-10383,1987.

Sonnenberg A., Modderman P.W. et Hogervorst F. Laminin receptors on platelets is the integrin VLA-6. Nature 336:487-489,1988a

Sonnenberg A., Hogervorst F., Osterop A. et Veltman F.E.M. Identification and characterization of a novel antigen complex on mouse mammary tumor cells using a monoclonal antibody against platelet glycoprotein Ic. J. Biol. Chem. 263(28):14030-14038,1988b.

Sonnenberg A., Linders C.J.T., Daams J.H. et Kennel S.J. The alpha6beta1 (VLA-6) and alpha6beta4 protein complexes: tissue distribution and biochemical properties. J. Cell. Sci. 96:207-217,1990a.

Sonnenberg A., Linders C.J., Modderman P.W., Damsky C.H., Aumailley M. et Timpl R. Integrin recognition of different cell-binding fragments of laminin (P1, E3, E8) and evidence that alpha6beta1 but not alpha6beta4 functions as a major receptor for fragment E8. *J. Cell. Biol.* 110(6):2145-2155,1990b.

Spinardi L., Einheber S., Cullen T., Milner T.A. et Giancotti F.G. A recombinant tail-less integrin beta4 subunit disrupts hemidesmosomes, but does not suppress alpha6beta4-mediated cell adhesion to laminins. *J Cell Biol.* 129(2):473-87, 1995.

Sterk L.M., Geuijen C.A., Oomen L.C., Calafat J., Janssen H. et Sonnenberg A. The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin alpha6beta4 and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *J. Cell. Biol.* 149(4):969-982,2000.

Stutzmann J., Bellissent-Waydelich A., Fontao L., Launay J.F. et Simon-Assman P. Adhesion complexes implicated in intestinal epithelial cell-matrix interactions. *Microsc. Res. Tech.* 51(2):179-190,2000.

Suzuki S. et Naitoh Y. Amino acid sequence of a novel integrin beta4 subunit and primary expression of the mRNA in epithelial cells. *EMBO J.* 9(3):757-63,1990.

Tang K., Nie D., Cai Y. et Honn K.V. The beta4 integrin subunit rescues A431 cells from apoptosis through a PI3K/Akt kinase signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264(1):127-132,1999.

Tamura R.N., Rozzo C., Starr L., Chambers J., Reichardt L.F., Cooper H.M. et Quaranta V. Epithelial integrin alpha6beta4: complete primary structure of alpha6 and variant forms of beta4. *J. Cell Biol.* 111(4):1593-604,1990.

Tamura R.N., Cooper H.M., Collo G. et Quaranta V. Cell type-specific integrin variants with alternative alpha chain cytoplasmic domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:10183-10187,1991.

Tanaka T., Parry D.A.D., Klaus-Kortun V., Steinert P.M. et Sanley J.R. Comparison of molecularly cloned bullous pemphigoid antigen to desmoplakin I confirms that they define a new family of cell adhesion junction plaque proteins. *J. Biol. Chem.* 266:12555-12559,1991.

Thomas J.O. et Kornberg R.D. An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72(7):2626-30,1975.

Toseren A. Kleinman H.K., Wu S., Mercurio A.M. et Byers S.W. Integrin alpha6 beta4 mediates dynamic interactions with laminin. *J. Cell. Sci.* 107(11):3153-3163,1994.

Treisman R. Journey to the surface of the cell: Fos regulation and SRE. *EMBO J.* 14:4905-4913,1995.

Unkeless J.C. et Jin J. Inhibitory receptor ITIM sequences and phosphatases. *Curr. Opin. Immunol.* 9:338-343,1997.

Vachon P.H. et J.-F. Beaulieu. Transcient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology.* 103:414-423,1992.

Vachon P.H. et J.-F. Beaulieu. Extracellular heterotrimeric laminin promotes differentiation in human enterocytes. *Am. J. Physiol.* 268:G857-G867,1995.

Van Leusden M.R., Kuikman I. et Sonnenberg A. The unique cytoplasmic domain of the human integrin variant β 4E is produced by partial retention of intronic sequences. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 132: 826-830,1997.

Van Leusden M.R., Kuikman I et Sonnenberg A. The unique cytoplasmic domain of the human integrin variant beta4E is produced by partial retention of intronic sequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235(3):826-30,1997.

Van Waes C., Kozarsky K.F., Warren A.B., Kidd L., Paugh D., Liebert M. et Carey T.E. The A9 antigen associated with aggressive human squamous carcinoma is structurally an fuctionally similar to the newly defined integrin alpha6beta4. *Cancer Res.* 51:2395-2402,1991.

Wiche G. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J. Cell. Sci.* 111(17):2477-2486,1998.

Xia Y., Gil S.G. et Carter W.G. Anchorage mediated by integrin alpha6beta4 to laminin 5 (epiligrin) regulates tyrosine phosphorylation of a membrane-associated 80-kD protein. *J. Cell. Biol.* 132(4):727-740,1996.

Yang Y., Dowling J., Yu Q.-C., Kouklis P., Cleveland D.W. et Fuchs E. An essential cytoskeletal linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. *Cell.* 86(4):655-665,1996.

Yee J.K., Friedmann T. et Burn J.C. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods in cell biology, Academic Press inc.* 43(5):99-112,1994.

Yoshikawa K. Controlling the higher-order structure of giant DNA molecules. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 52(3):235-244,2001.

Yurchenco P.D. et Schittny J.C. Molecular architecture of Basement membranes. *FASEB J.* 4:1577-1590,1990.